

ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΙ

Βιοκαταλύτες

- Ως **ακινητοποίηση** ή **καθήλωση** (immobilization) βιοκαταλύτη (ενζύμου, πολυενζυμικού συστήματος, κυττάρου) ορίζεται ο περιορισμός του σε στερεά φάση, διακριτή από την κύρια υγρή φάση.
- Έτσι, έχουμε σχηματισμό ετερογενούς συστήματος.
- Η ακινητοποίηση πρέπει να επιτρέπει την αμφίδρομη μεταφορά υποστρωμάτων, προϊόντων, οξυγόνου, κλπ, μεταξύ στερεάς και υγρής φάσης.

Γιατί ακινητοποίηση?

- Βελτίωση σταθερότητας του βιοκαταλύτη.
- Εύκολη και άμεση παραλαβή προϊόντος, αφού ο βιοκαταλύτης και το προϊόν βρίσκονται σε διαφορετικές φάσεις.
- Εύκολος και άμεσος έλεγχος της αντίδρασης με απλή προσθήκη ή αφαίρεση βιοκαταλύτη.

- Δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του βιοκαταλύτη λόγω ακινητοποίησής του στον φορέα.
- Επιτάχυνση της διεργασίας λόγω επίτευξης υψηλών συγκεντρώσεων βιοκαταλύτη και χρήση κυττάρων που δεν βρίσκονται στη φάση ανάπτυξης.
- Υψηλή παραγωγικότητα λόγω δυνατότητας χρησιμοποίησης των βιοκαταλυτών σε διαδικασίες συνεχούς λειτουργίας και απομάκρυνσης των προϊόντων και των ανεπιθύμητων μεταβολικών παραπροϊόντων που δρουν ως αναστολείς.
- Βελτιωμένος έλεγχος της παραγωγικής διαδικασίας στα συστήματα συνεχούς διεργασίας.
- Προϊόν απαλλαγμένο ενζύμων/κυττάρων λόγω του φυσικού διαχωρισμού του βιοκαταλύτη από το προϊόν.
- Μικρότερος κίνδυνος μόλυνσεων λόγω υψηλής δραστηριότητας και υψηλών συγκεντρώσεων των ακινητοποιημένων κυττάρων.

- Δυνατότητα χρησιμοποίησης αντιδραστήρων μικρότερου μεγέθους και συνεπώς μείωση του επενδυτικού κόστους.
- Μείωση του χρόνου ωρίμανσης του προϊόντος σε ορισμένες περιπτώσεις (π.χ. παραγωγή κρασιού, μπύρας, κλπ).

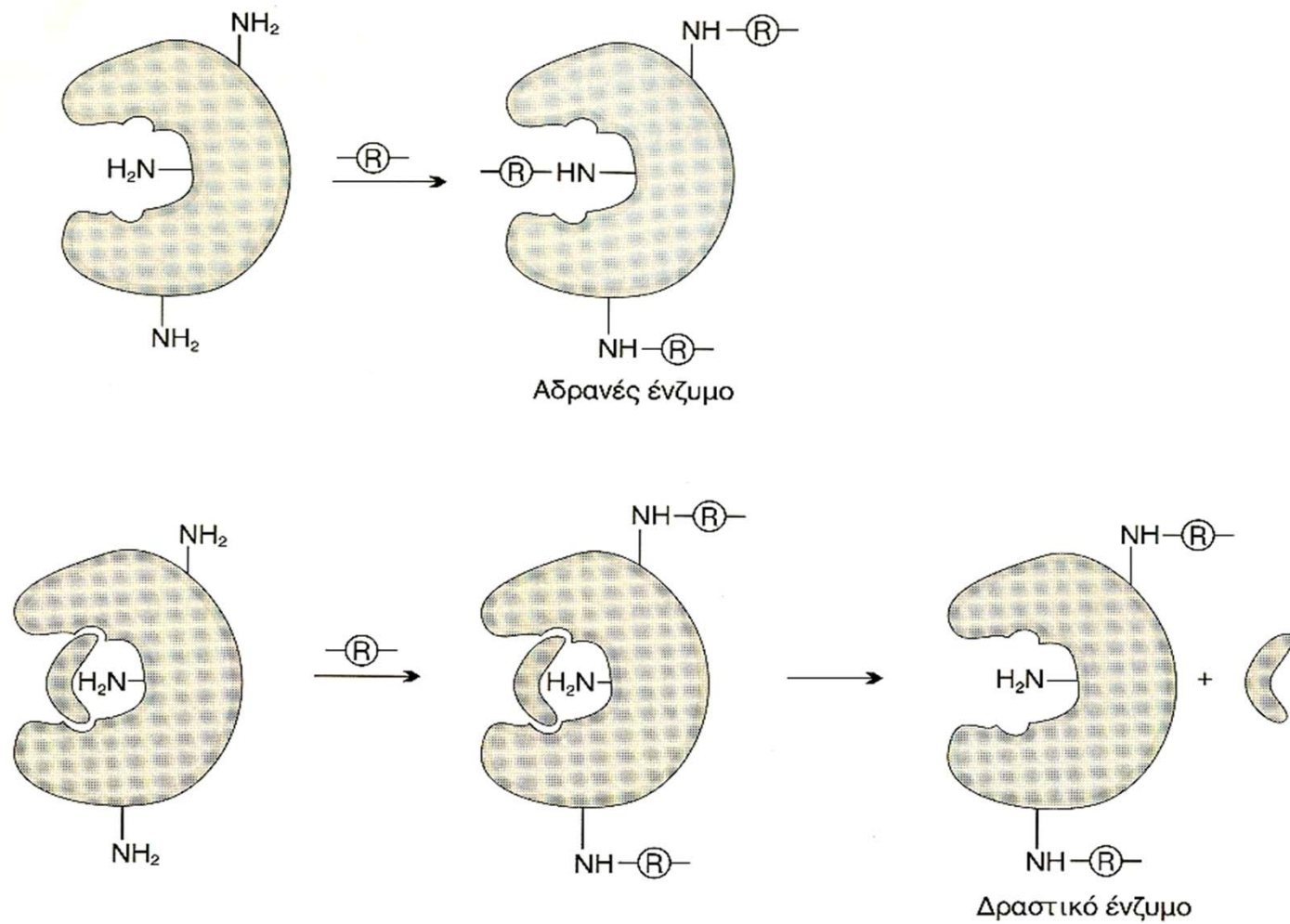
Ακίνητοποίηση ενζύμων

- Οι μέθοδοι ακίνητοποίησης ενζύμων διακρίνονται σε:

A. Χημικές, και

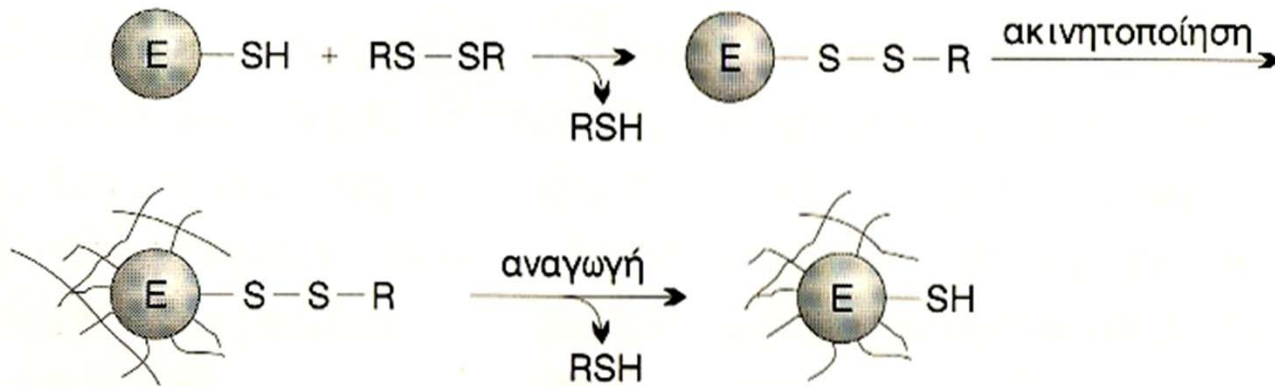
B. Φυσικές.

- Οι χημικές τεχνικές αποτελούν την πιο συνήθη επιλογή.
- Είναι προφανές ότι κατά την ακίνητοποίηση οι πλευρικές ομάδες του ενεργού κέντρου του ενζύμου πρέπει να παραμένουν ενεργές.
- Αυτό επιτυγχάνεται:
 1. Παρουσία είτε ενζυμικού υποστρώματος, είτε συναγωνιστικού αναστολέα.
- Και στις δύο περιπτώσεις το ενεργό κέντρο είναι προστατευμένο και διατηρείται η ενζυμική δραστηριότητα.



Σχ. 33. Προστασία ενζύμου παρουσία υποστρώματος ή αναστολέα.

2. Μέσω προσωρινού σχηματισμού αντιστρέψιμου συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα με ομοιοπολικό δεσμό.



Σχ. 34. Προστασία ενζύμου μέσω προσωρινού σχηματισμού αντιστρέψιμου συμπλόκου ενζύμου-αναστολέα με ομοιοπολικό δεσμό.

3. Με χρήση πρόδρομης αδρανούς μορφής του ενζύμου.

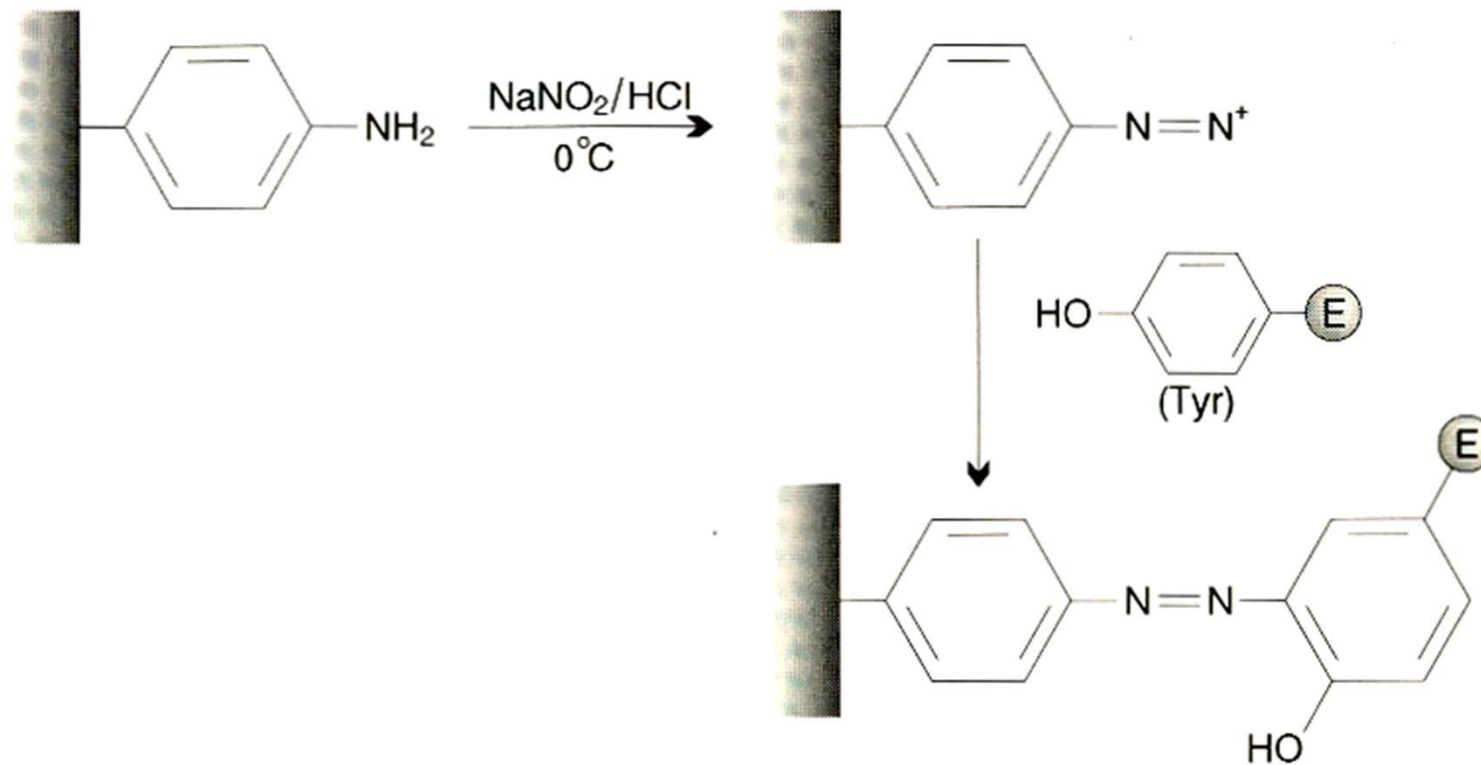
- Οι ομάδες του ενζύμου που χρησιμοποιούνται κυρίως στην ακινητοποίηση είναι η ε-αμινομάδα της Lys και η αμινομάδα του N-τελικού άκρου.
- Η -SH της Cys, αν και δραστικότερη από την αμινομάδα (π.χ. της Lys) και την υδροξυλομάδα (π.χ. Tyr, Ser, Thr), αποφεύγεται, καθώς ο σχηματιζόμενος θειοεστέρας είναι λιγότερο σταθερός από την αμίνη ή από τον εστέρα.
- Λαμβάνοντας υπόψιν και τη συχνότητα εμφάνισης των αμινοξέων στα ένζυμα, η προτίμηση των θέσεων ακινητοποίησης κατά φθίνουσα σειρά έχει ως εξής:

Lys (-NH₂), Cys (-SH), Tyr (Ph-OH), His (ημιδαζολομάδα), Asp (-COOH), Glu (-COOH), Arg, Trp (ινδολομάδα), Ser (-CH₂OH), Thr (-CH(OH)CH₃) και Met (-S-CH₃).

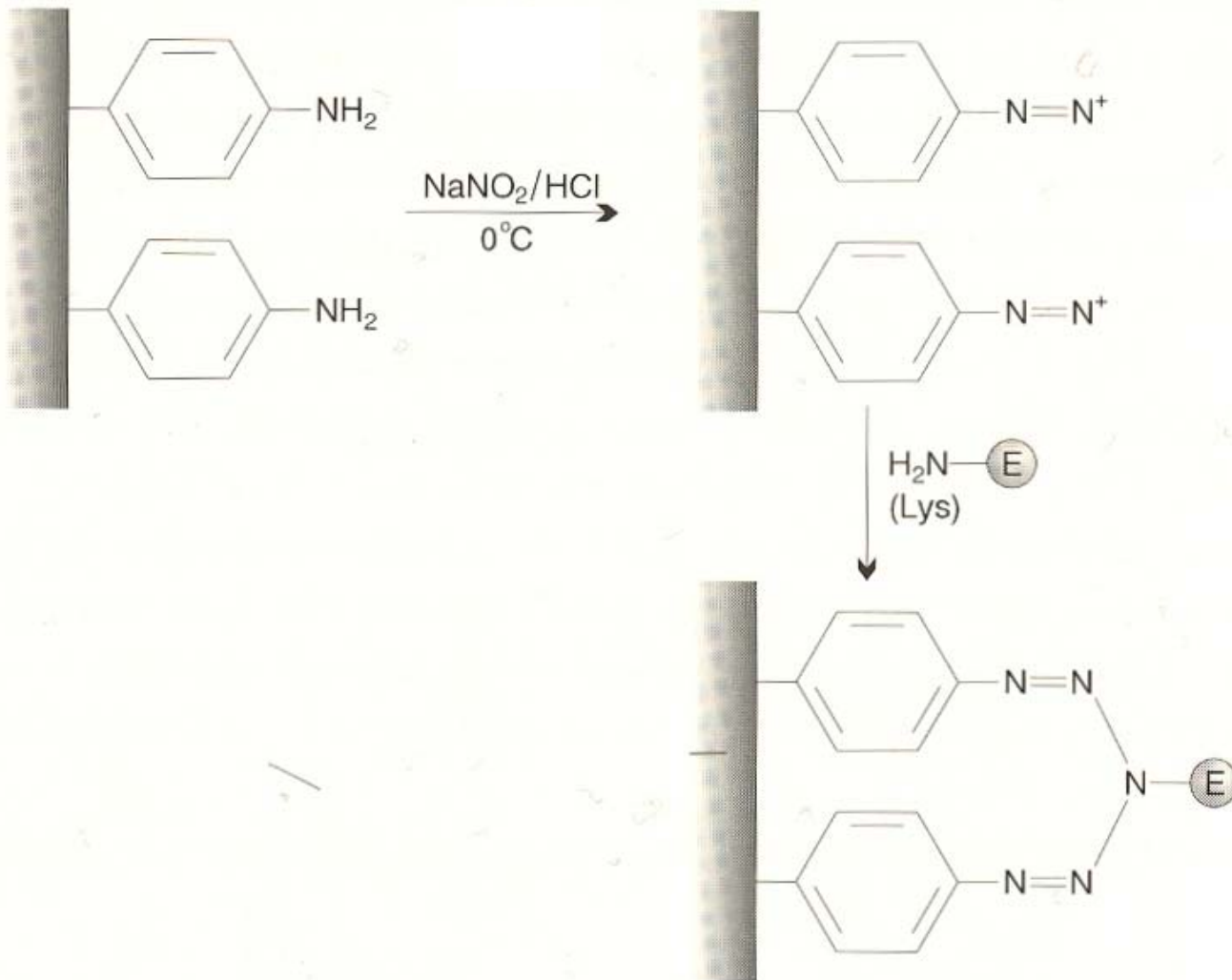
Αντιδράσεις ακινητοποίησης ενζύμων

Χημικές Τεχνικές

Διαζώτωση

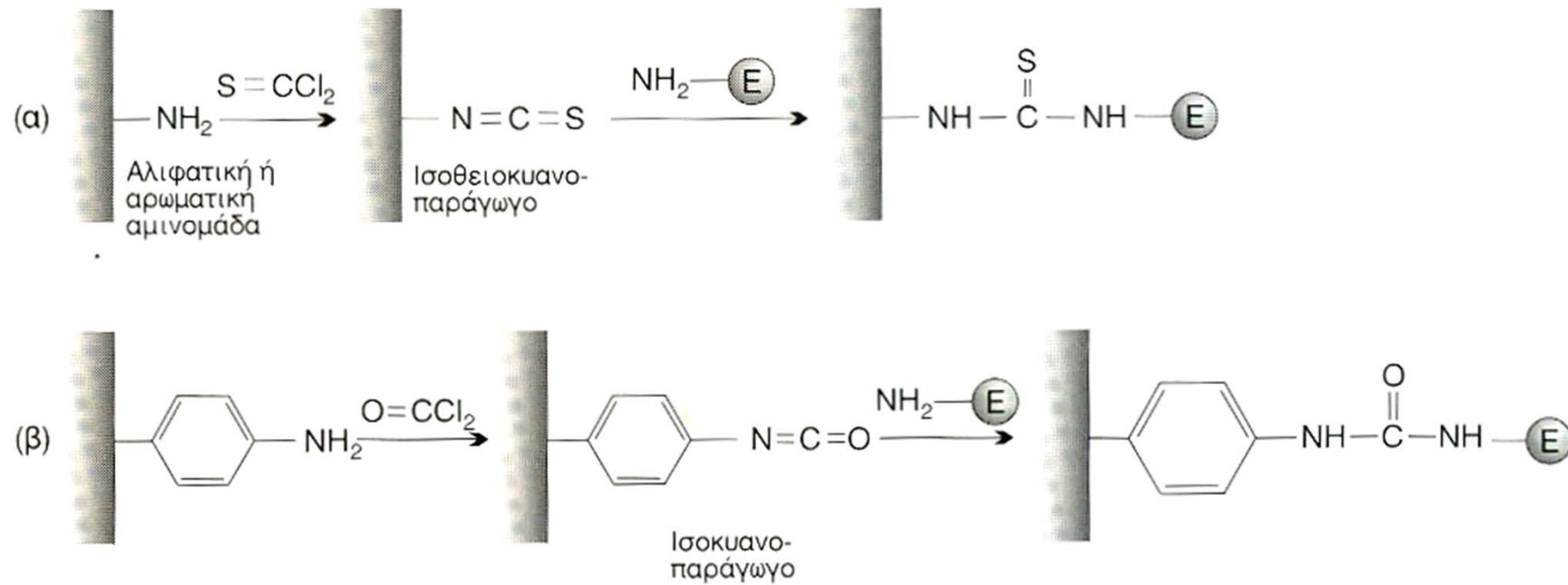


Σχ. 35α. Ακινητοποίηση ενζύμων μέσω σχηματισμού αζωδεσμών.

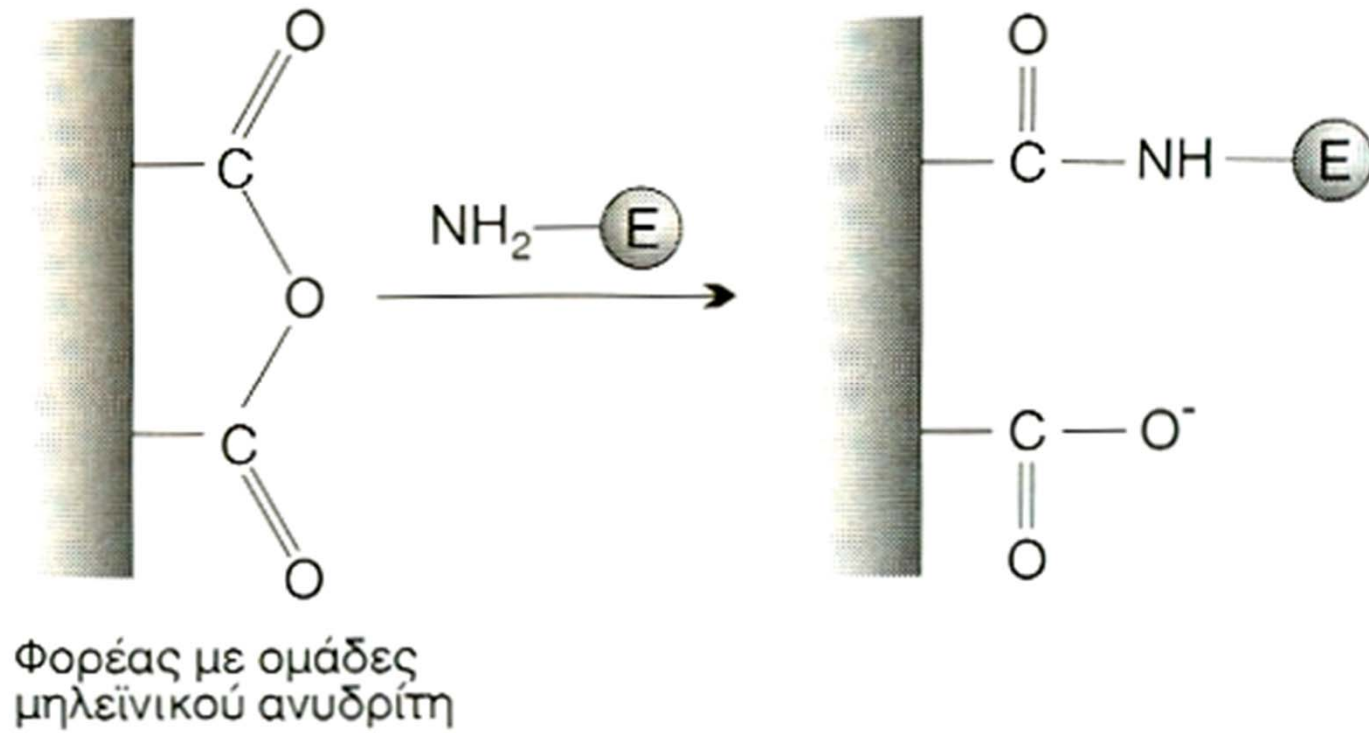


Σχ. 35β. Ακίνητοποίηση ενζύμων μέσω σχηματισμού αζωδεσμών.

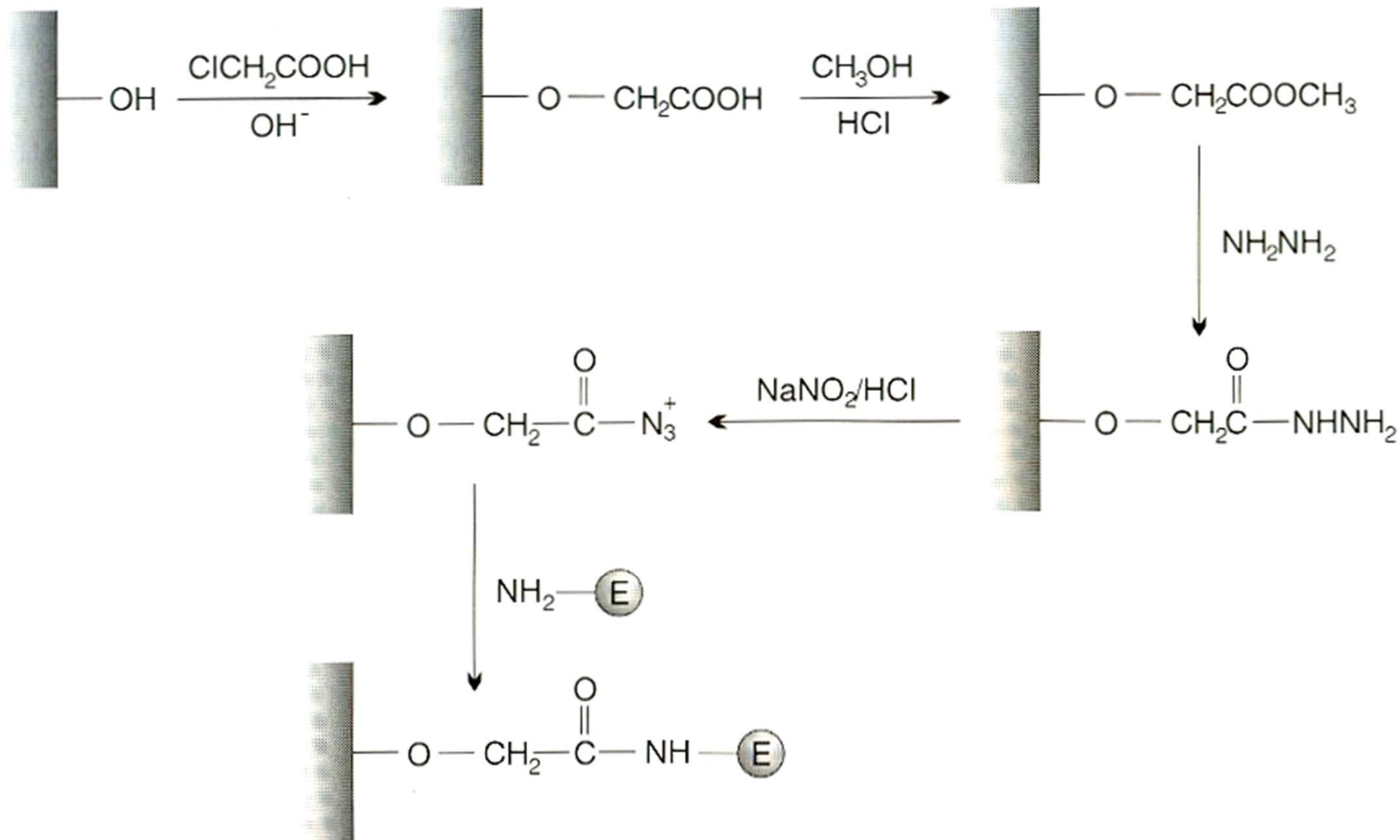
Σχηματισμός αμιδικού δεσμού



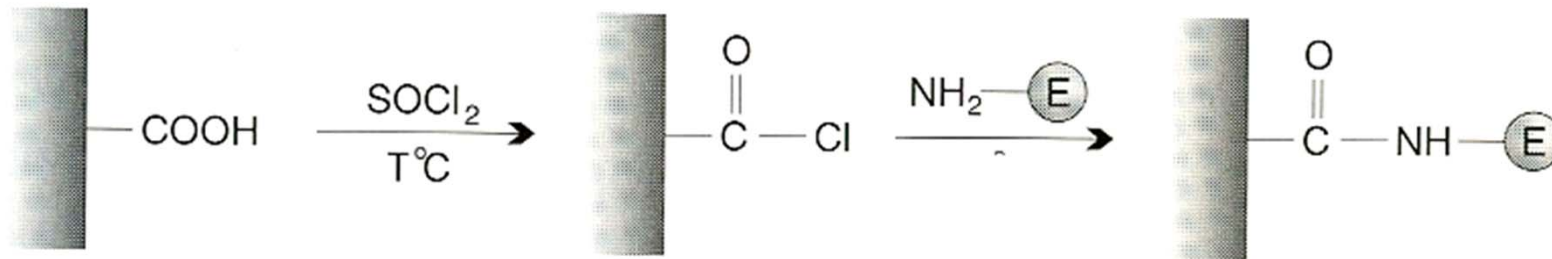
Σχ. 36. Ακίνητοποίηση ενζύμων μέσω σχηματισμού αμιδικών δεσμών.



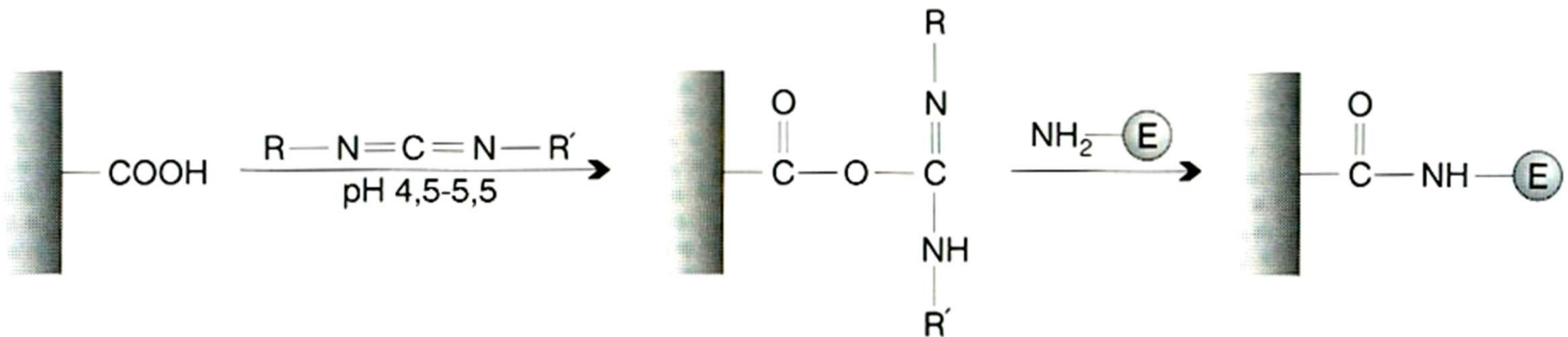
Σχ. 37. Ακίνητοποίηση ενζύμου σε ενεργοποιημένο φορέα με μηλεϊνικό ανυδρίτη.



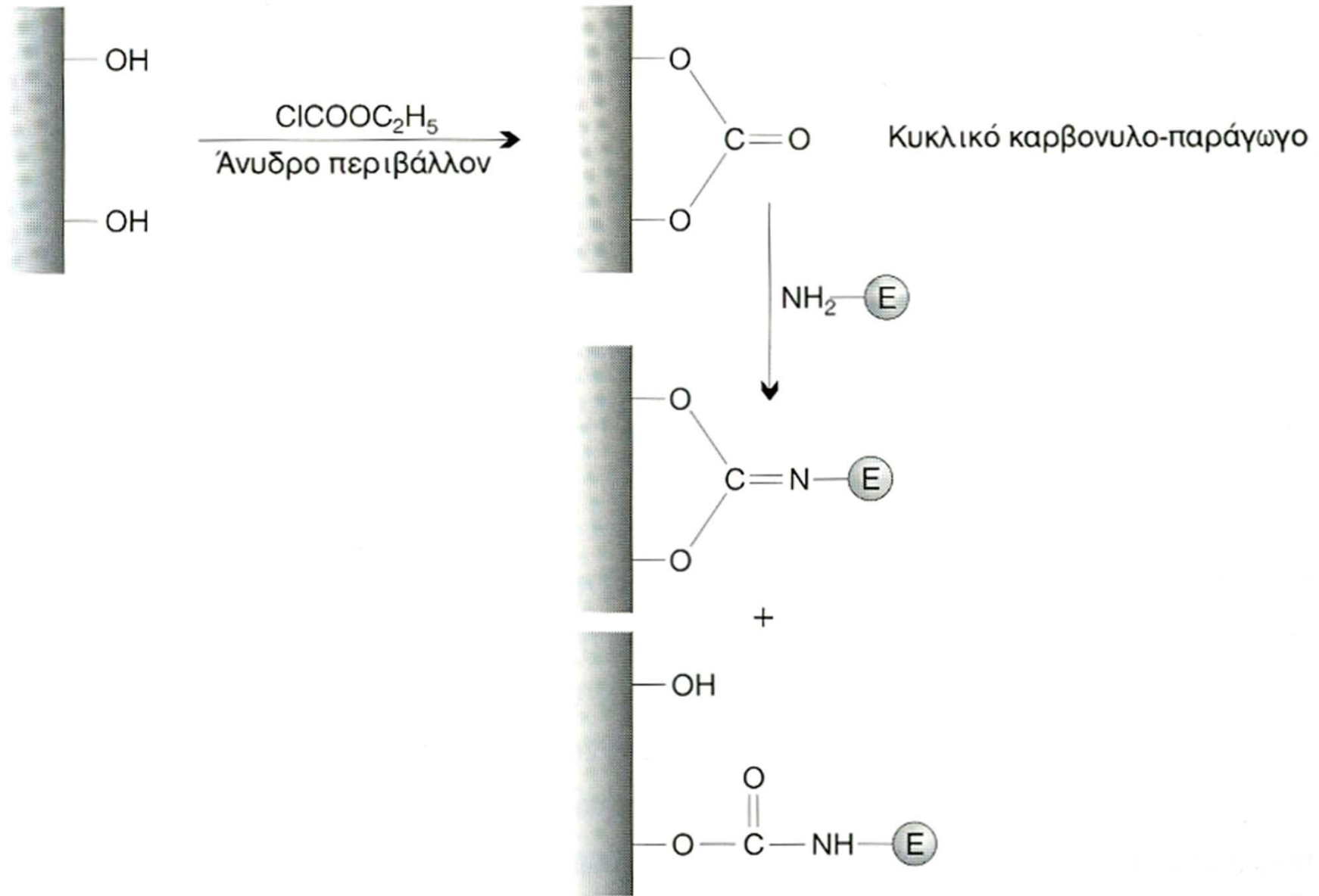
Σχ. 38. Ακίνητοποίηση ενζύμων με σχηματισμό ακυλαζιδο-παραγώγων (πεπτιδο-μέθοδος).



Σχ. 39. Ακίνητοποίηση ενζύμων μέσω ενεργοποίησης του φορέα με θειονυλο-χλωρίδιο υπό βρασμό.

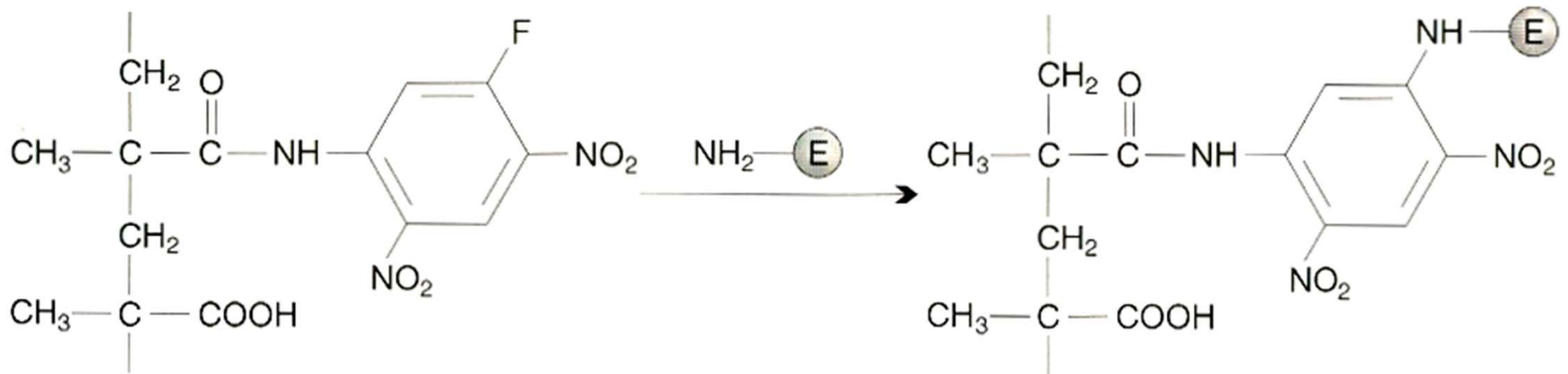


Σχ. 40. Ακίνητοποίηση ενζύμων μέσω ενεργοποίησης του φορέα με καρβοδιιμίδια.

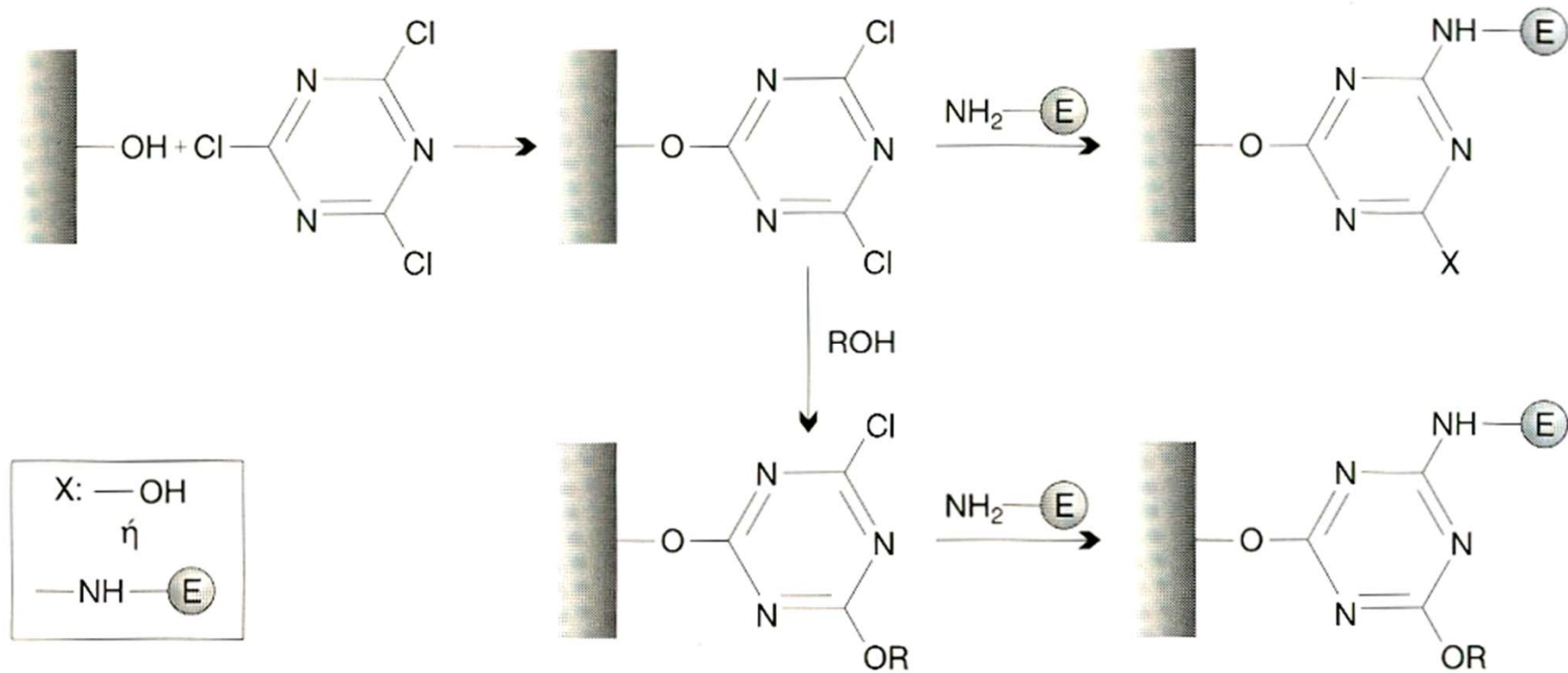


Σχ. 41. Ακινητοποίηση ενζύμων με σχηματισμό δραστικών κυκλικών καρβονυλο-παραγώγων.

Αντιδράσεις αρυλιώσεως και αλκυλιώσεως

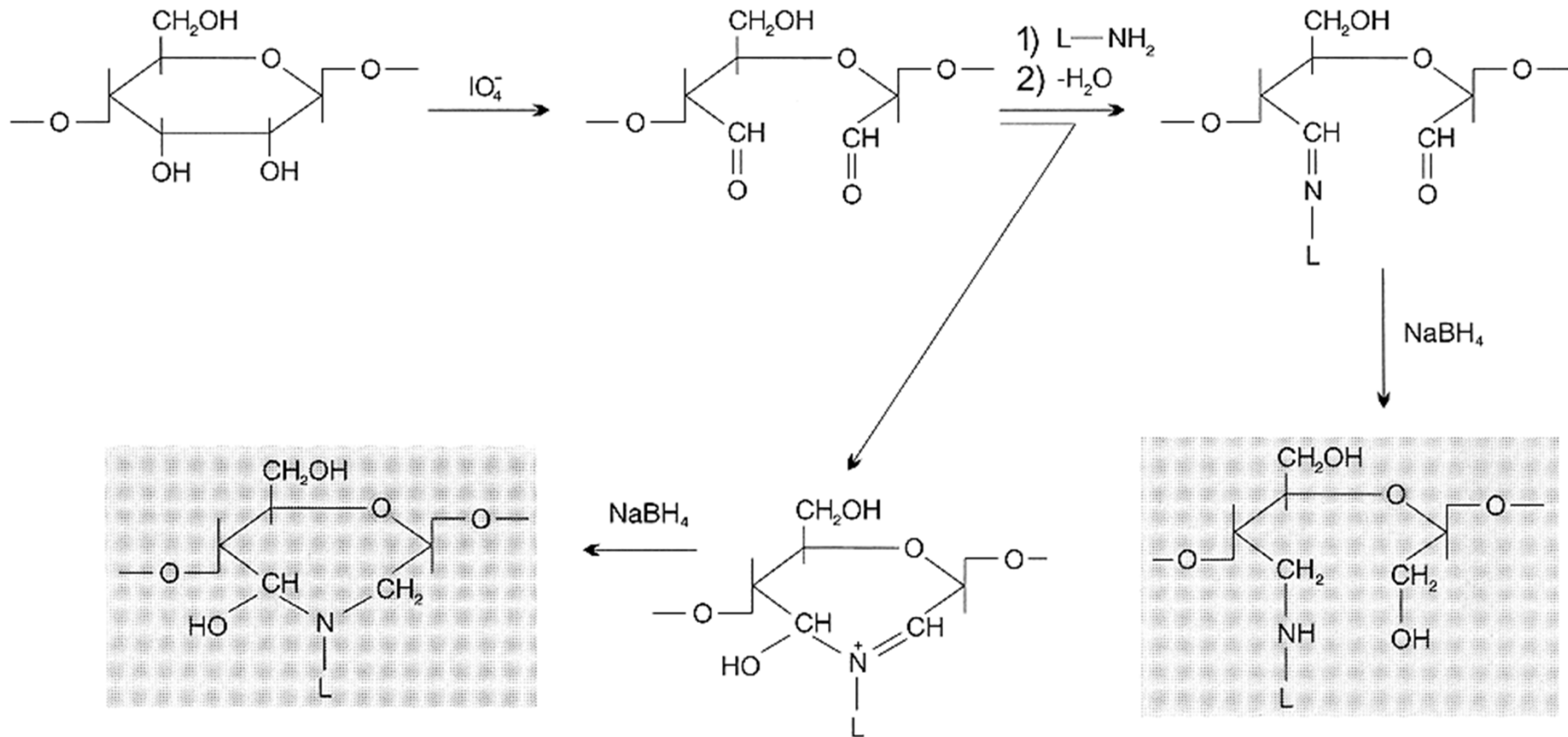


Σχ. 42. Ακίνητοποίηση ενζύμου σε δραστικό συνθετικό ακρυλο-φθοριούχο πολυμερές.



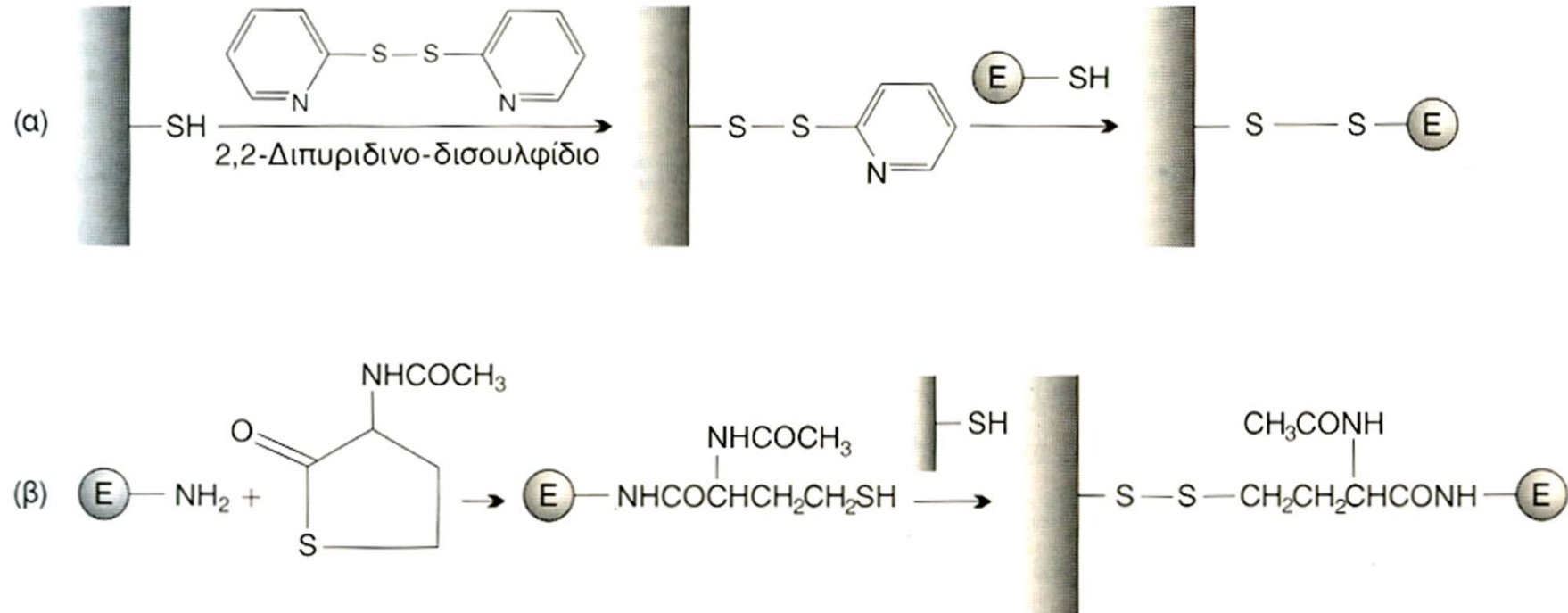
Σχ. 43. Ακίνητοποίηση ενζύμου μέσω ενεργοποίησης των υδροξυλομάδων του φορέα με κυανουρικό οξύ.

Σχηματισμός βάσης Schiff



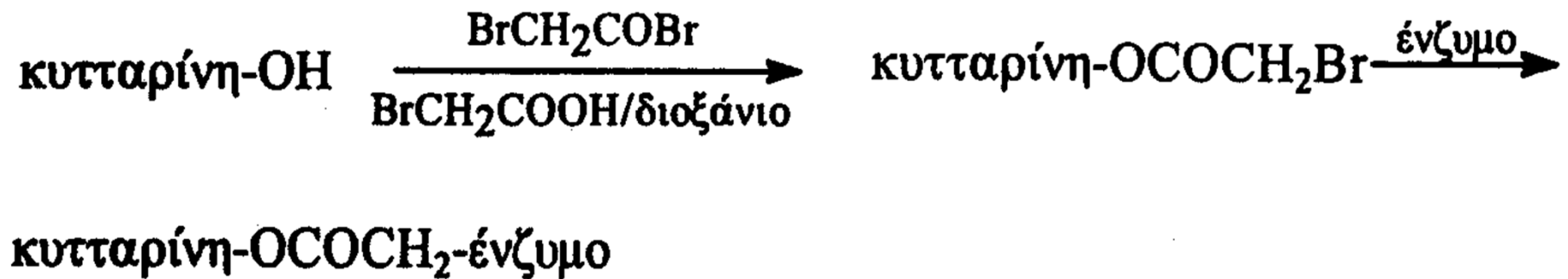
Σχ. 44. Ακίνητοποίηση ενζύμου μέσω σχηματισμού βάσης Schiff.

Σχηματισμός δισουλφιδικών δεσμών



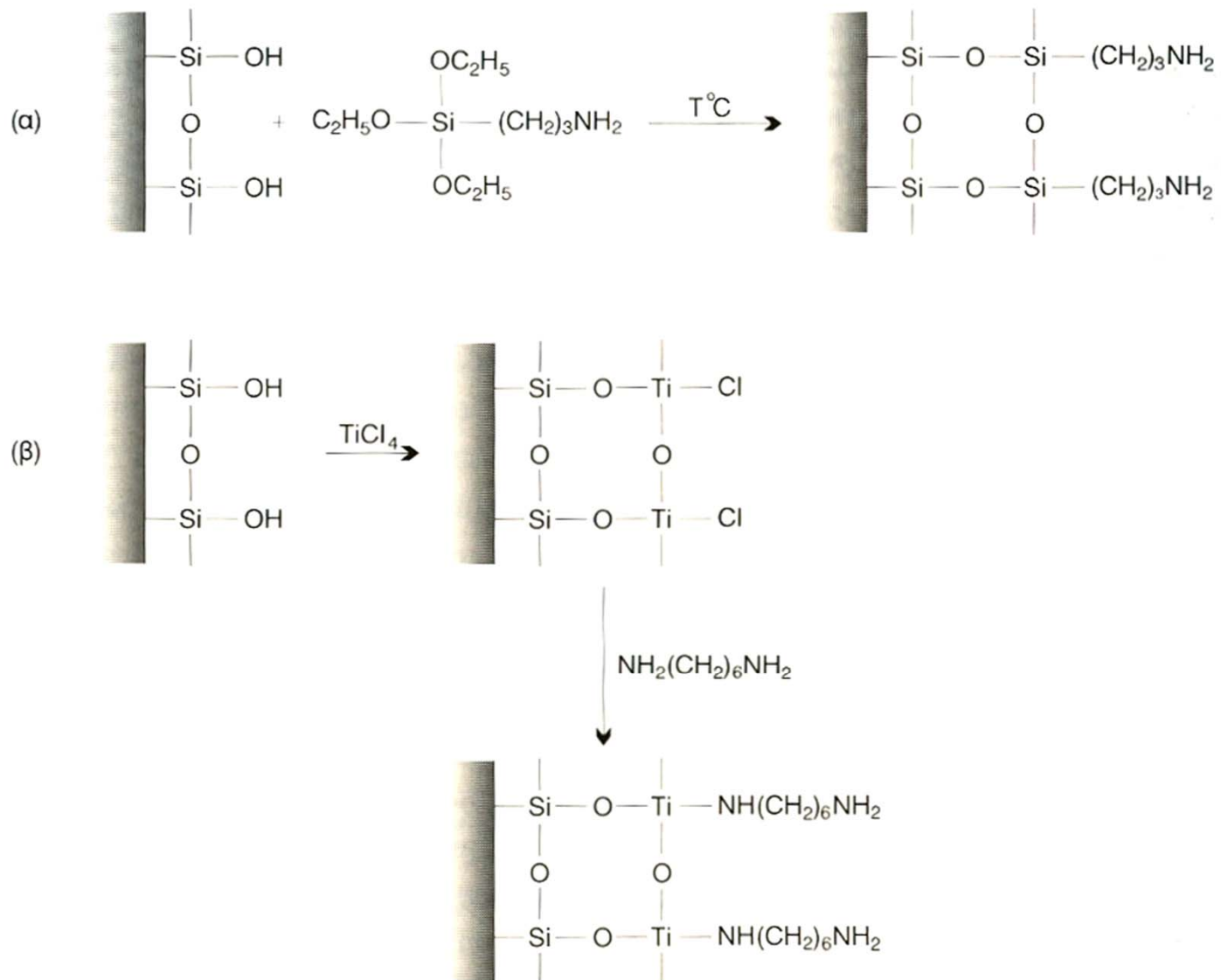
Σχ. 45. Ακίνητοποίηση ενζύμου μέσω σχηματισμού δισουλφιδικού δεσμού.

Ακυλίωση (ενεργοποιημένη κυτταρίνη)

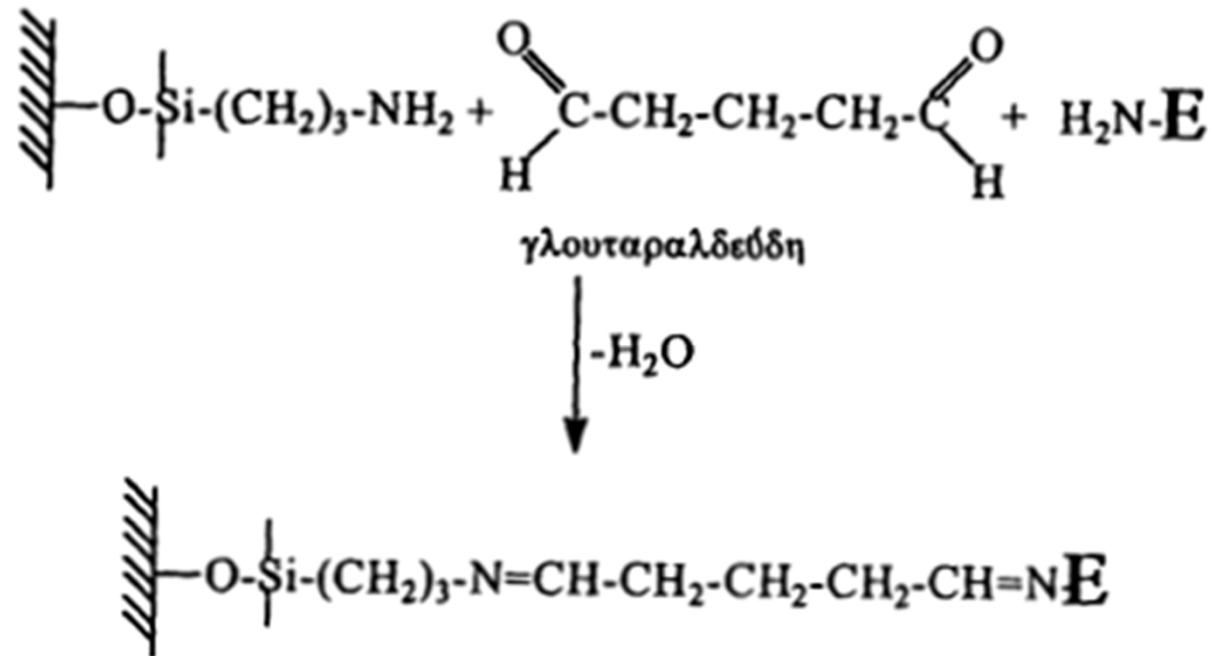
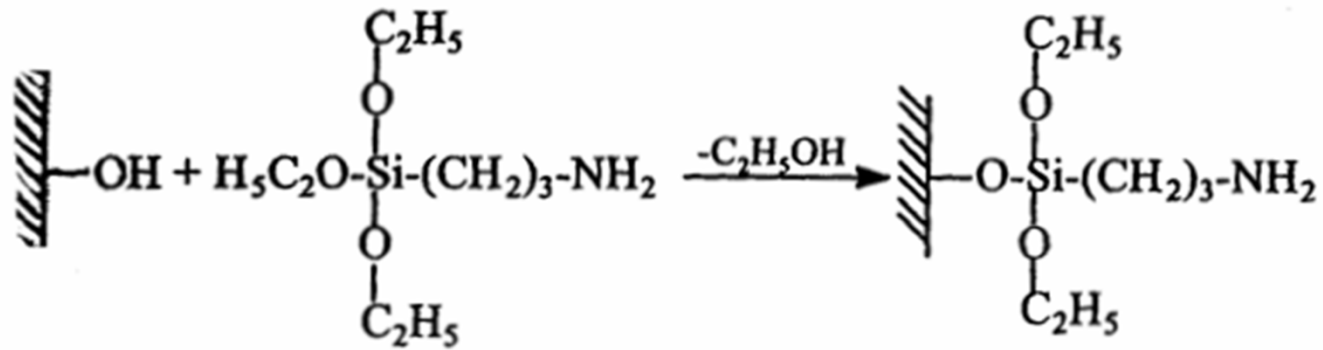


Σχ. 46. Ακινητοποίηση ενζύμου σε ενεργοποιημένη κυτταρίνη.

Ακίνητοποίηση σε ανόργανα υλικά



Σχ. 47. Ενεργοποίηση επιφανειών ανόργανων υλικών.

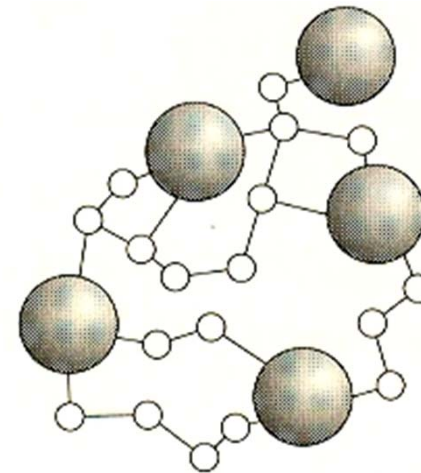
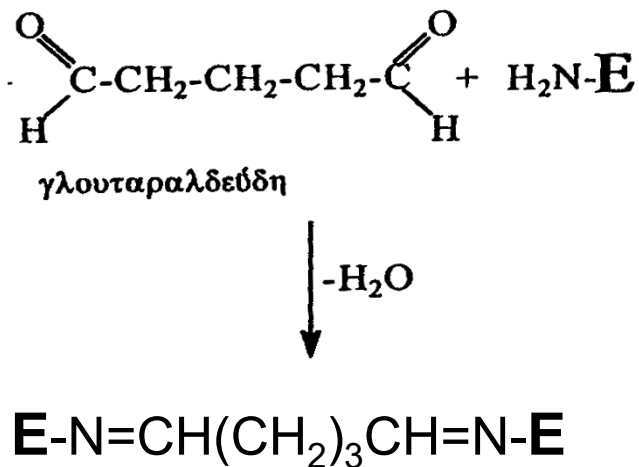


Ένζυμο συνδεδεμένο σε γυαλί

Σχ. 48. Ακίνητοποίηση σε πορώδες γυαλί.

Διαμοριακή σύνδεση

- Βασίζεται στον σχηματισμό πλέγματος μέσω ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ μορίων του ενζύμου και διδραστικών αντιδραστηρίων (π.χ. γλουταραλδεΐδης).
- Απαιτείται πυκνό διάλυμα ενζύμου (συνήθως 50-200mg/mL).
- Κατά τη διαμοριακή σύνδεση μεγάλο μέρος της ενζυμικής δραστηρότητας χάνεται και γι' αυτό συνίσταται να πραγματοποιείται παρουσία υποστρώματος ή αναστολέα για την προστασία του ενεργού κέντρου.
- Γενικά, η τεχνική χρησιμοποιείται κυρίως για ακινητοποίηση πολυενζυμικών συστημάτων ή κυττάρων.



Σχ. 49. Διαμοριακή σύνδεση ενζύμων.

Σχ. 50. Διαμοριακό πλέγμα.

- Η γλουταραλδεΐδη χρησιμοποιείται και για την παρασκευή ομοιοπολικά συνδεδεμένων ενζυμικών κρυστάλλων (cross-linked enzyme crystals, CLECs).
- Η μορφή των κρυστάλλων είναι αδιάλυτη και αποτελείται μόνο από κρυστάλλους ενζύμου.
- Λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε ένζυμο, σε αντίθεση με ακινητοποιημένα ένζυμα σε στερεό φορέα όπου ο φορέας αποτελεί το 90-95%, παρουσιάζουν υψηλή παραγωγικότητα.
- Παρουσιάζουν, επίσης, υψηλή θερμοανθεκτικότητα.

Φυσικές Τεχνικές

Προσρόφηση

- Η προσρόφηση του ενζύμου στο φορέα πραγματοποιείται είτε λόγω ηλεκτροστατικών ή υδρόφοβων δυνάμεων.

- Η ακινητοποίηση λόγω ηλεκτροστατικών δυνάμεων παρουσιάζει το μειονέκτημα της εύκολης «αποκόλλησης» του ενζύμου, λόγω:

1. Μεταβολής του pH,

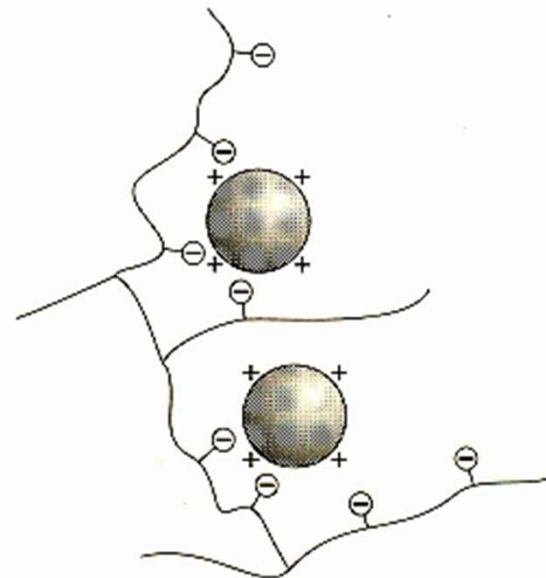
2. Μεταβολής της ιοντικής ισχύς, και

3. Υποστρώματος όταν παρουσιάζει αντίθετο φορτίο με τον φορέα ακινητοποίησης.

- Το πλεονέκτημα της ακινητοποίησης λόγω ηλεκτροστατικών δυνάμεων είναι η εύκολη αναγέννηση του ακινητοποιημένου βιοκαταλύτη, δηλαδή η απομάκρυνση των αδρανών μορίων ενζύμου και φόρτιση με νέα ποσότητα δραστικού ενζύμου.

- Για την προσρόφηση λόγω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων, το ένζυμο τροποποιείται με την εισαγωγή κατάλληλων υδρόφοβων μορίων (ενώνονται με ομοιοπολικούς δεσμούς) και επιλέγεται κατάλληλος φορέας με ανάλογα υδρόφοβα χαρακτηριστικά.
- Όταν το τροποποιημένο ένζυμο και ο υδρόφοβος φορέας βρεθούν σε υδατικό περιβάλλον αλληλεπιδρούν λόγω υδρόφοβων δυνάμεων και το ένζυμο ακινητοποιείται.
- Η παρουσία επιφανειοδραστικών ουσιών προκαλεί συνήθως την αντιστροφή του φαινομένου και την επαναδιαλυτοποίηση του ενζύμου.

Σχ. 51. Ακινητοποίηση ενζύμων λόγω προσρόφησης.



Εγκλωβισμός

- Ο όρος αυτός περιγράφει τον περιορισμό του ενζύμου στο εσωτερικό της δομής πολυμερούς υλικού.

- Είναι προφανές ότι οι πόροι του πολυμερούς πρέπει να έχουν κατάλληλο μέγεθος, έτσι ώστε:

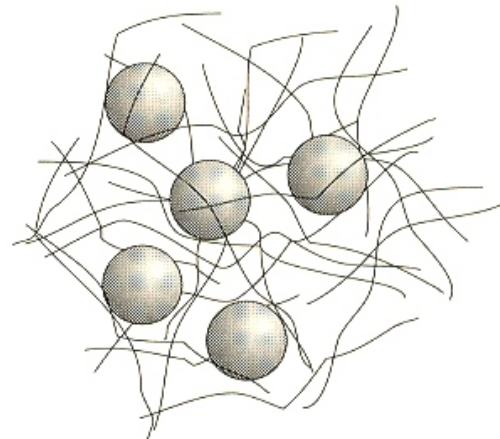
1. Να μην παρουσιάζεται διαφυγή του ενζύμου, και

2. Να μην παρεμποδίζεται η μεταφορά υποστρώματος και προϊόντος προς και από τον βιοκαταλύτη αντίστοιχα.

- Συνήθως χρησιμοποιούνται:

- A. Φυσικά πολυμερή (κυρίως πολυσακχαρίτες), όπως άγαρ, κ-καρραγενάνη, αλγινικό ασβέστιο, κλπ.

- B. Πολυακρυλαμίδιο.



Σχ. 52. Εγκλωβισμός ενζύμων.

Εγκαψυλλίωση (encapsulation)

- Το ένζυμο βρίσκεται ελεύθερο και διαλυμένο στο εσωτερικό ημιπερατής μεμβράνης μικροσφαιριδίου ή μικροκαψυλλίου διαμέτρου 1-100 μ m.
- Προϋπόθεση είναι η σταθερότητα του ενζύμου υπό μορφή διαλύματος.
- Το μέγεθος των πόρων πρέπει να είναι κατάλληλο, ώστε:
 1. Να επιτρέπει τη διέλευση μορίων υποστρώματος, προϊόντος, αλάτων, κλπ, και
 2. Να μην είναι εφικτή η διαφυγή του ενζύμου.
- Πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι:
 1. Η μεγάλη ειδική επιφάνεια,
 2. Η υψηλή ταχύτητα μεταφοράς μάζας,

3. Ο υψηλός βαθμός συγκράτησης ενζύμου, και

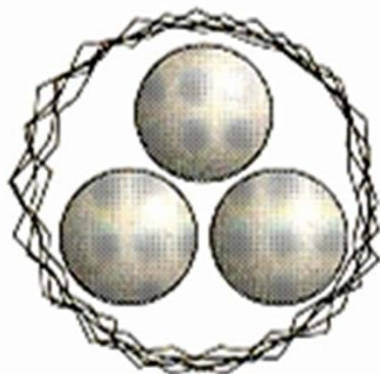
4. Η δυνατότητα ταυτόχρονης ακινητοποίησης περισσότερων του ενός ενζύμου.

• Μειονεκτήματα της μεθόδου είναι:

1. Η μειωμένη μηχανική σταθερότητα,

2. Η μεγάλη απώλεια ενζυμικής δραστηκότητας λόγω επαφής του ενζύμου με οργανικούς διαλύτες, μονομερή, κλπ, κατά την εγκαψυλλίωση.

• Γι' αυτό, συνήθως, προστίθεται κατάλληλη σταθεροποιητική ουσία στο ενζυμικό διάλυμα πριν την έναρξη της διεργασίας.



Σχ. 54. Εγκαψυλλίωση ενζύμου.

Επίδραση της ακινητοποίησης στα χαρακτηριστικά του ενζύμου

A. Στα μοριακά χαρακτηριστικά του ενζύμου

Μεταβολές της στερεοδιάταξης του ενζυμικού μορίου

- Για να διατηρηθεί η ενζυμική δραστηριότητα, είναι απαραίτητο:

1. Οι πλευρικές ομάδες των αμινοξέων του ενεργού κέντρου να παραμένουν ελεύθερες, και

2. Το ενζυμικό μόριο να λαμβάνει ελεύθερα την κατάλληλη στερεοδιάταξη κατά την ενζυμική αντίδραση.

- Στα ακινητοποιημένα ένζυμα οι παραπάνω δύο προϋποθέσεις δεν ικανοποιούνται πάντα γιατί:

A. Κατά την ακινητοποίηση είναι δυνατόν να αντιδράσουν με τον φορέα αμινοξέα του ενεργού κέντρου κατά τρόπο μη αντιστρεπτό.

- Γι' αυτό συνίσταται η ακινητοποίηση να λαμβάνει χώρα παρουσία υποστρώματος.

B. Πολλές φορές το ακινητοποιημένο ένζυμο δεσμεύεται στον φορέα σε περισσότερα του ενός σημεία, με αποτέλεσμα να έχουμε μείωση του βαθμού ελευθερίας του βιομορίου για στερεοδιατακτικές μεταβολές.

- Γι' αυτό συνίσταται η ακινητοποίηση του ενζύμου σε δύο στάδια, π.χ.:

(i) Το ένζυμο παρουσία υποστρώματος, έτσι ώστε να έχουμε την επιθυμητή στερεοδιάταξη, αντιδρά μέσω ελεύθερων αμινομάδων με δραστικό μονομερές (π.χ. Cl-CO-CH=CH_2), και στη συνέχεια,

(ii) Το τροποποιημένο ένζυμο προστίθεται στο μίγμα αντιδράσεως πολυμερισμού (π.χ. ακρυλαμιδίου) παρουσία πάντα υποστρώματος.

- Το ακινητοποιημένο ένζυμο είναι δεσμευμένο σε πολλά σημεία έχοντας την κατάλληλη στερεοδιάταξη.

Στερεοχημικοί περιορισμοί

- Καθώς ο φορέας βρίσκεται πολύ κοντά στο ενζυμικό μόριο, στερεοχημικοί περιορισμοί επηρεάζουν την ενζυμική δραστηριότητα ποικιλοτρόπως:

1. Σταθεροποιώντας τη δομή του ενζυμικού μορίου και αυξάνοντας τη λειτουργική σταθερότητα, π.χ. η ακινητοποίηση πρωτεολυτικών ενζύμων τα προστατεύει από την αυτόλυση, διατηρώντας την καταλυτική τους δράση για μεγάλο χρονικό διάστημα.

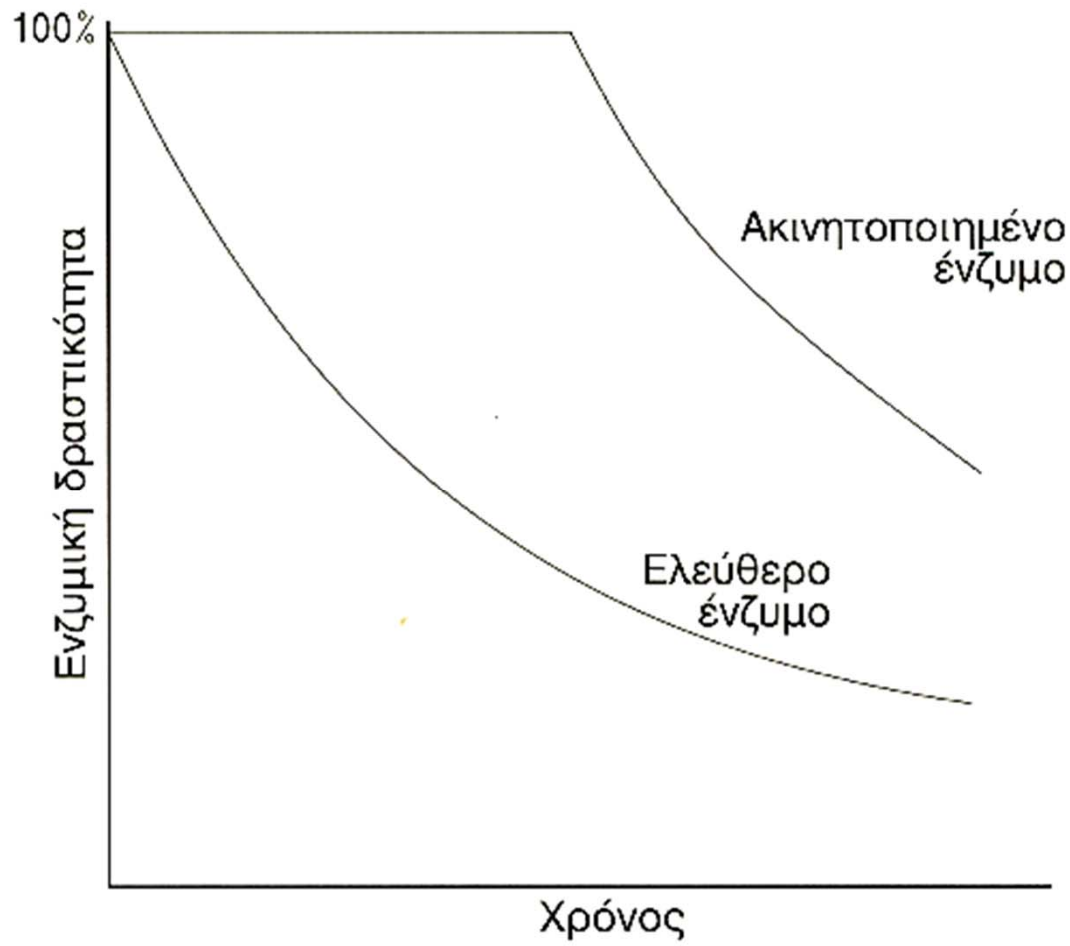
2. Λόγω περιορισμού (παρεμποδίσεως) μεταφοράς υποστρώματος στο ένζυμο, μειώνεται η ενζυμική δραστηριότητα.

- Το φαινόμενο είναι πιο έντονο στα μεγάλα μεγέθους μόρια, τα οποία «δυσκολεύονται» να πλησιάσουν μόρια ακινητοποιημένου ενζύμου που βρίσκονται στο εσωτερικό του πλέγματος.

3. Κατά την ακινητοποίηση, είναι δυνατόν μόρια ενζύμου να δεσμεύονται με τέτοιο τρόπο, ώστε το ενεργό κέντρο να είναι προσανατολισμένο προς την δομή του πλέγματος, με επακόλουθο την παρεμπόδιση της εισόδου του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο και συνεπώς τη μείωση της δραστηριότητας.

Λειτουργική σταθερότητα

- Τα μόρια υποστρώματος που εισχωρούν στο σφαιρίδιο του φορέα μετατρέπονται αμέσως σε προϊόν πριν διαχυθούν στο εσωτερικό του.
- Συνεπώς, μόρια ενζύμου που βρίσκονται ακινητοποιημένα βαθύτερα στο σφαιρίδιο δεν έρχονται σε επαφή με το υπόστρωμα και δεν συμμετέχουν στην αντίδραση.
- Έτσι, δεν έχουμε μείωση δραστηριότητας και η αντίδραση καθορίζεται από την ταχύτητα διάχυσης υποστρώματος στο σφαιρίδιο.
- Με την πάροδο του χρόνου όμως, τα δραστικά ενεργά κέντρα του ενζύμου ελαττώνονται βαθμιαία και το σύστημα ελέγχεται πλέον όχι μόνο από τον ρυθμό διάχυσης, αλλά και από τον αριθμό δραστικών ενεργών κέντρων.

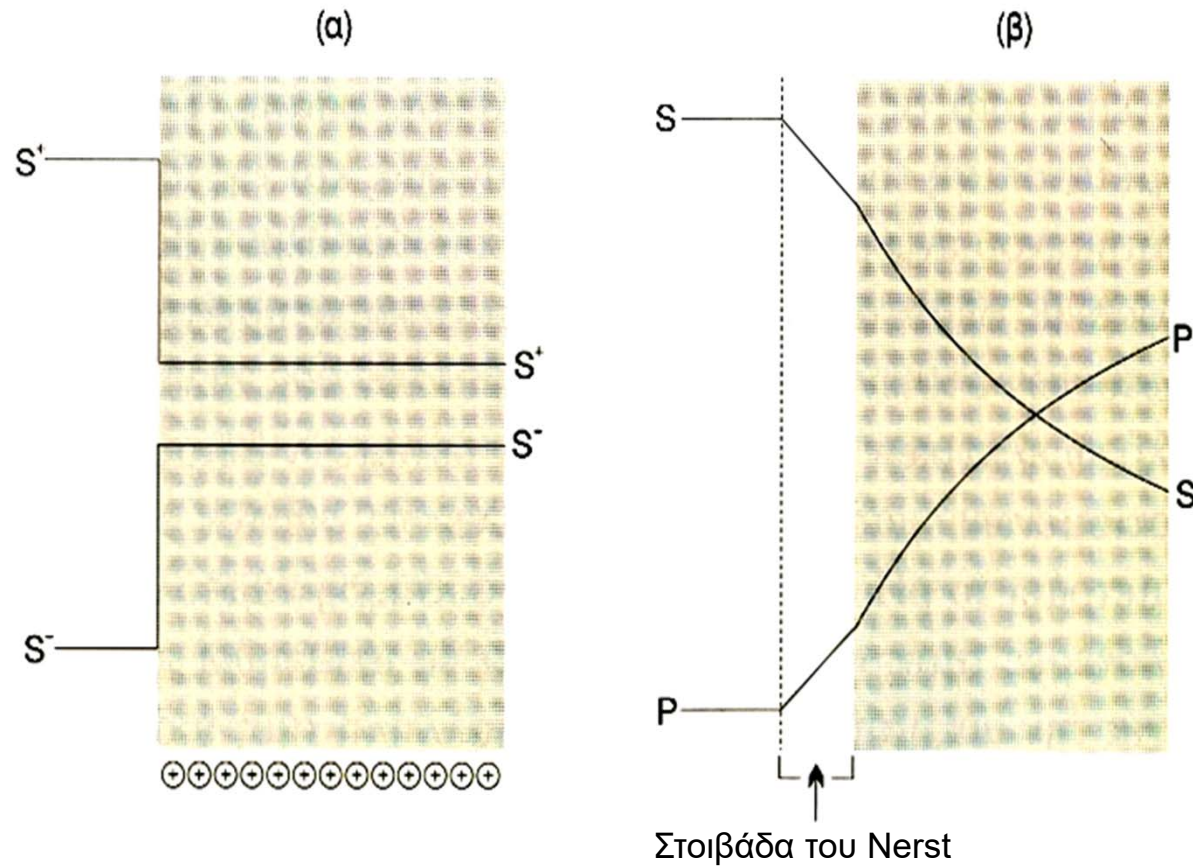


Σχ. 55. Αύξηση λειτουργικής σταθερότητας ακίνητοποιημένων ενζύμων.

B. Στα κινητικά χαρακτηριστικά του ενζύμου

- Ο φορέας είναι δυνατόν να επηρεάσει τα κινητικά χαρακτηριστικά του ενζύμου, είτε με φαινόμενα **κατανομής** ή με φαινόμενα **διάχυσης**.
- Η κατανομή πρωτονίων, υποστρώματος, προϊόντος, κλπ, μεταξύ κύριας (κινούμενης) φάσης και βιοκαταλυτικής (στατικής) υγρής φάσης, δηλαδή αυτής που περιέχεται στα σφαιρίδια, επηρεάζεται από τον χημικό χαρακτήρα τόσο των ομάδων του φορέα, όσο και των μορίων της υγρής φάσης.
- Τα φαινόμενα κατανομής είναι αποτέλεσμα ελκτικών ή απωστικών δυνάμεων μεταξύ μορίων της υγρής φάσης και του φορέα, οδηγώντας σε αύξηση ή μείωση της συγκέντρωσης, αντίστοιχα, συγκεκριμένων μορίων στο ενζυμικό μικροπεριβάλλον.
- Η παρεμπόδιση της ελεύθερης διάχυσης μορίων στο εσωτερικό του σφαιριδίου του φορέα οδηγεί σε βαθμιαία μείωση της συγκέντρωσης του υποστρώματος και σε βαθμιαία αύξηση της συγκέντρωσης του προϊόντος.

- Αρχικά, τα μόρια διασχίζουν τη *στοιβάδα του Nerst*, η οποία δημιουργείται από μόρια διαλύτη περιορισμένης κινητικότητας.

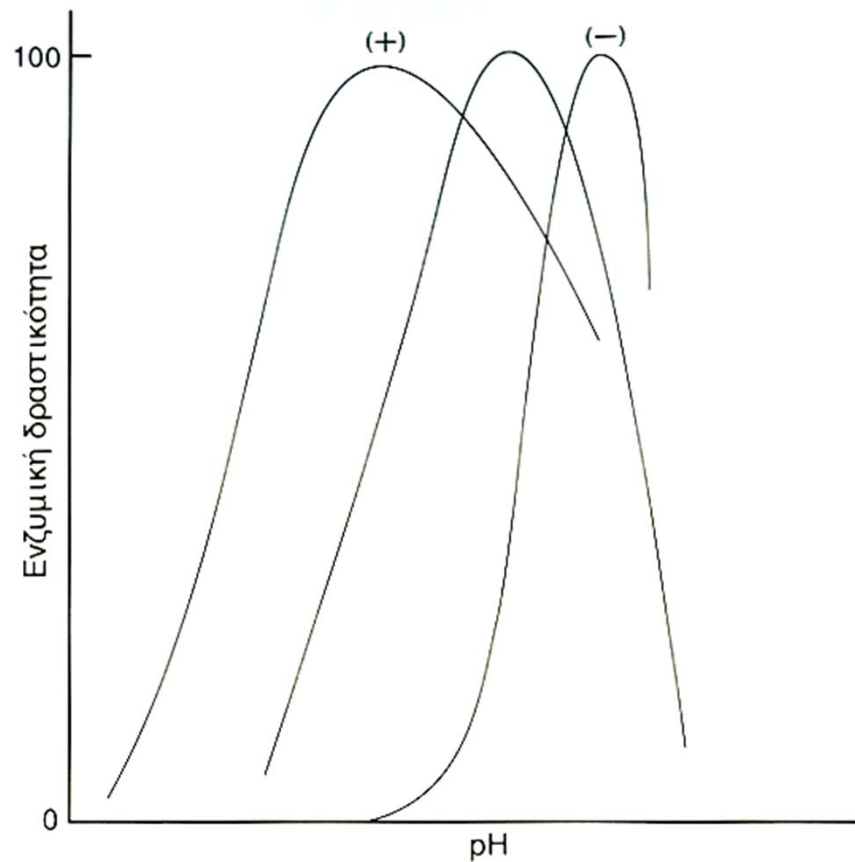


Σχ. 56. Φαινόμενα (α) κατανομής, (β) διάχυσης σε σύστημα ακινητοποιημένου βιοκαταλύτη. S: υπόστρωμα, P: προϊόν. Η σκιασμένη περιοχή αναφέρεται στο βιοδραστικό πολυμερές.

- Με την είσοδο των μορίων (π.χ. υποστρώματος) στο εσωτερικό του βιοκαταλυτικού φορέα, παρατηρείται παρεμπόδιση της ελεύθερης διακίνησης μορίων στο εσωτερικό του, λόγω τόσο της δομής του φορέα, όσο και της ενζυμικής αντίδρασης (μη γραμμική διαβάθμιση).
- Σε κατάσταση δυναμικής ισορροπίας του συστήματος, ο ρυθμός εισόδου μορίων στον φορέα ισούται με τον ρυθμό απομακρύνσεως.

Επίδραση στο pH

- **Κατανομή πρωτονίων.** Ανάλογα με το είδος των φορτίων του φορέα, η συγκέντρωση πρωτονίων του ενζυμικού μικροπεριβάλλοντος διαμορφώνεται σε τιμές χαμηλότερες ή υψηλότερες από τις τιμές της κύριας υγρής φάσης.
- Συνεπώς, έχουμε μετατόπιση της καμπύλης pH (επομένως και της βέλτιστης τιμής pH) σε σχέση με αυτήν του ελεύθερου ενζύμου.
- Έστω ότι ο φορέας έχει αρνητικά φορτία. Τότε παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης πρωτονίων του ενζυμικού μικροπεριβάλλοντος και μείωση του τοπικού pH.
- Αυτό λαμβάνεται ως μετατόπιση του βέλτιστου pH προς μεγαλύτερες τιμές.
- Το αντίθετο συμβαίνει όταν ο φορέας έχει θετικά φορτία.



Σχ. 57. Επίδραση στο βέλτιστο pH αντιδράσεως ακινητοποιημένου ενζύμου, (-) ακινητοποιημένο ένζυμο σε πολυ-ανιονικό πολυμερές, (+) ακινητοποιημένο ένζυμο σε πολυ-κατιονικό πολυμερές. Η μεσαία καμπύλη αναφέρεται σε ελεύθερο ένζυμο.

- Το φαινόμενο παρατηρείται σε συστήματα χαμηλής ιοντικής ισχύος και εξαλείφεται αν αυξηθεί η ιοντική ισχύς της υγρής φάσης.

- **Περιορισμός διαχύσεως πρωτονίων.** Έστω ότι το ένζυμο είναι ακινητοποιημένο σε σφαιρίδια μη φορτισμένου φορέα και ότι η ενζυμική αντίδραση απελευθερώνει πρωτόνια.
- Τότε η συγκέντρωση των πρωτονίων στο ενζυμικό μικροπεριβάλλον αυξάνεται λόγω περιορισμού της διάχυσης.
- Αν η αντίδραση αρχίσει σε pH υψηλότερο του βέλτιστου (pH°), η μείωση του pH στο μικροπεριβάλλον προς τιμές πλησιέστερες του pH° θα οδηγήσει σε αύξηση της ταχύτητας αντιδράσεως, παραγωγή περισσότερων πρωτονίων, περαιτέρω μείωση του pH, νέα αύξηση της ταχύτητας, κ.ο.κ.
- Δηλαδή το σύστημα λειτουργεί ως αυτοκαταλυόμενο.
- Τελικά, το σύστημα επέρχεται σε δυναμική ισορροπία, στην οποία ο ρυθμός παραγωγής πρωτονίων ισούται με τον ρυθμό διάχυσής τους προς την κύρια υγρή φάση.

- Για $pH > pH^0$ έχουμε πάντα $V_{max}/V^0_{max} < 1$ (όπου V^0_{max} η μέγιστη ταχύτητα ενζυμικής αντιδράσεως σε pH^0) και γενικά ο λόγος είναι μεγαλύτερος για το ακινητοποιημένο ένζυμο παρά για το ελεύθερο.
- Ο λόγος V_{max}/V^0_{max} αυξάνεται συνεχώς όσο το pH πλησιάζει το pH^0 και τείνει προς την μονάδα.
- Σε χαμηλούς περιορισμούς διαχύσεως πρωτονίων, το pH του ενζυμικού μικροπεριβάλλοντος λαμβάνει την τιμή pH^0 , όπου και έχουμε δυναμική ισορροπία.
- Σε μεγάλες τιμές περιορισμού διαχύσεως, ο ρυθμός διαχύσεως πρωτονίων είναι μικρότερος του ρυθμού παραγωγής, οπότε το σύστημα ισορροπεί και υπολειτουργεί σε $pH < pH^0$.
- Αν η ενζυμική αντίδραση αρχίσει σε $pH < pH^0$, τότε τα παραγόμενα πρωτόνια μειώνουν ακόμα περισσότερο το pH του μικροπεριβάλλοντος, έχουμε απομάκρυνση από το pH^0 και μείωση της ταχύτητας αντιδράσεως (το σύστημα αυτοπεριορίζεται).

Επίδραση στην σταθερά *Michaelis-Menten*

- **Κατανομή υποστρώματος.** Η συγκέντρωση υποστρώματος στο ενζυμικό μικροπεριβάλλον ($[S]_e$) διαφέρει από την συγκέντρωση υποστρώματος στην κυρίως υγρή φάση ($[S]$).

- Από την σχέση (8) έχουμε:

$$u = V'_{\max}[S]_e/(K_m + [S]_e) \quad (24)$$

- Αν ορίσουμε τον συντελεστή κατανομής υποστρώματος

$$p_s = [S]_e/[S] \quad (25)$$

- Τότε η (24) γίνεται:

$$u = V'_{\max}[S]/\{(K_m/p_s) + [S]\} \quad (26)$$

- Ορίζουμε την φαινομενική τιμή της K'_m ως:

$$K'_m = K_m/p_s \quad (27)$$

- Αν οι δυνάμεις μεταξύ υποστρώματος και φορέα είναι ελκτικές, τότε έχουμε αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στο ενζυμικό μικροπεριβάλλον, συνεπώς έχουμε $p_s > 1$ και $K'_m < K_m$.
- Αντίθετα, αν το υπόστρωμα απωθείται από τον φορέα, τότε $K'_m > K_m$.
- Ανάλογα φαινόμενα παρατηρούνται και με τους αναστολείς του ενζύμου και την σταθερά αναστολής K_i .

• **Περιορισμός διάχυσης υποστρώματος.** Λόγω του φαινομένου περιορισμού διαχύσεως έχουμε πάντα $K'_m > K_m$, αφού για να υπάρξει στο ενζυμικό μικροπεριβάλλον του ακινητοποιημένου ενζύμου συγκέντρωση υποστρώματος ίση με K_m , θα πρέπει η αντίστοιχη συγκέντρωση υποστρώματος στην κύρια φάση να είναι μεγαλύτερη, λόγω φαινομένου διάχυσης.

• Ισχύει η σχέση:

$$h_s([S]-[S_e]) = \frac{V_{\max} [S_e]}{[S_e] + K_m} \quad (28)$$

• Όπου: $h_s = D_s/\delta$: συντελεστής μεταφοράς υποστρώματος ή άλλου μορίου

D_s : συντελεστής διαχύσεως υποστρώματος ή άλλου μορίου

δ : πάχος στοιβάδας *Nerst*.

- Μείωση της K'_m προς την τιμή της K_m ως αποτέλεσμα ταχύτερης διάχυσης είναι δυνατόν να επιτευχθεί εάν αυξηθεί η ταχύτητα αναμίξεως στον βιοαντιδραστήρα, με στόχο τη μείωση του δ .
- Η ποσοτική περιγραφή της επίδρασης του περιορισμού διάχυσης στο εσωτερικό του φορέα είναι πιο πολύπλοκη.
- Ελάττωση του περιορισμού διάχυσης στο εσωτερικό του φορέα επιτυγχάνεται με μείωση του πάχους της στερεάς φάσης.

Επίδραση στην μέγιστη ταχύτητα

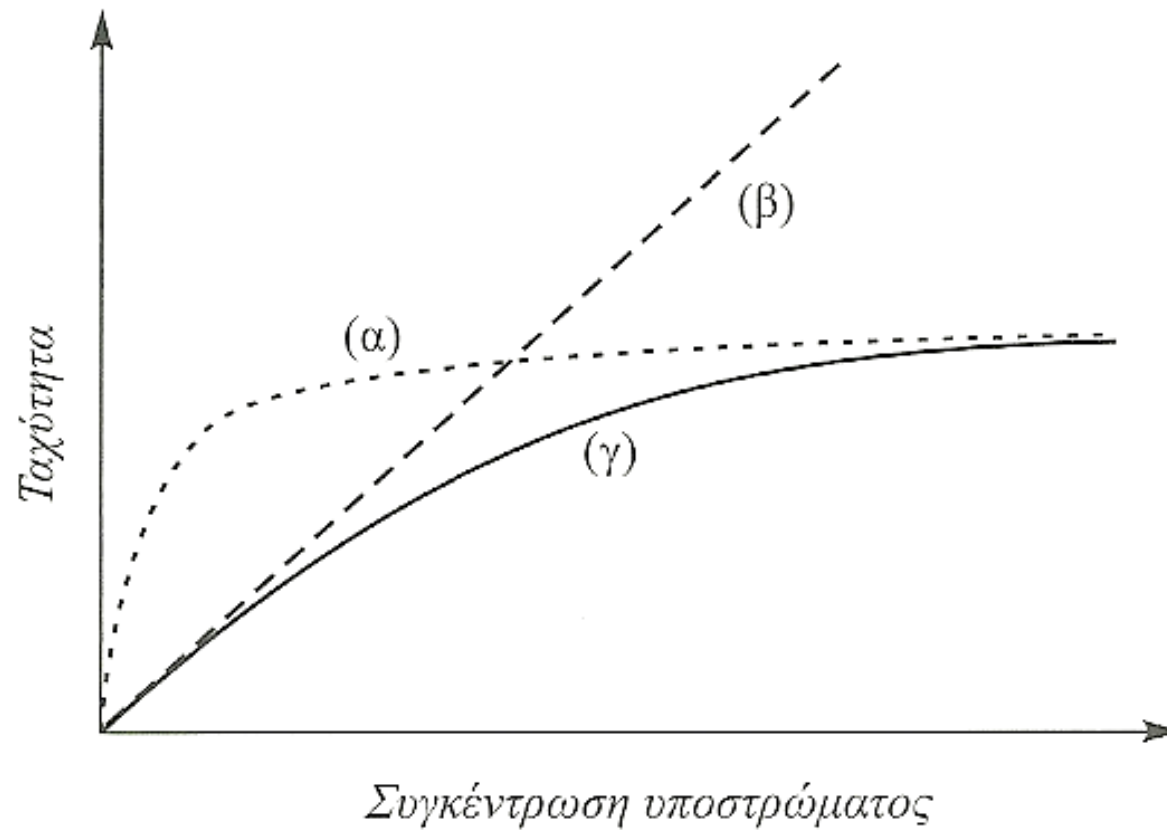
- Η ταχύτητα αντίδρασης ακινητοποιημένου ενζύμου είναι αποτέλεσμα περιοριστικού ελέγχου της:

1. Ταχύτητας διαχύσεως του υποστρώματος στον φορέα, και

2. Πραγματικής ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης.

- Το αποτέλεσμα της δράσης των δύο αυτών παραγόντων εκφράζει τελικά την ταχύτητα αντιδράσεως του ακινητοποιημένου ενζύμου.

- Σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος, περιοριστικός παράγοντας είναι η ταχύτητα διάχυσης υποστρώματος, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις η πραγματική ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης.



Σχ. 58. Γραφική παράσταση (α) ταχύτητας αντίδρασης ελεύθερου ενζύμου, (β) ταχύτητας διαχύσεως του υποστρώματος στον φορέα, και (γ) μετρούμενης (φαινομενικής) ταχύτητας ακινητοποιημένου ενζύμου σε σχέση με την συγκέντρωση υποστρώματος.

- Γενικά:

1. Ο περιορισμός της διάχυσης μειώνεται με αύξηση της συγκέντρωσης υποστρώματος.

2. Η γνωστή γραφική παράσταση των διπλών αντιστρόφων (ευθεία) ταχύτητας αντίδρασης προς συγκέντρωση υποστρώματος, δεν είναι ευθεία (απόκλιση), όπως στην περίπτωση ελεύθερου ενζύμου.

3. Η αύξηση της θερμοκρασίας δεν επιφέρει μείωση του περιορισμού διαχύσεως όπως αναμενόταν, αλλά τελικά οδηγεί σε επιδείνωση του φαινομένου, επειδή η θερμοκρασία έχει πολύ μεγαλύτερη επίδραση στην ενζυμική δραστηριότητα παρά στην ταχύτητα διαχύσεως (π.χ. για διπλασιασμό της ενζυμικής δραστηριότητας απαιτείται αύξηση θερμοκρασίας κατά 10°C , ενώ για διπλασιασμό της ταχύτητας διαχύσεως απαιτείται αύξηση της θερμοκρασίας κατά 300°C περίπου).

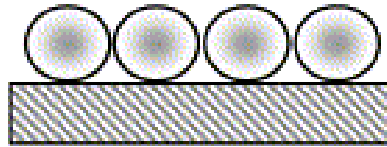
Επίδραση στην αναστολή της ενζυμικής αντίδρασης

- Φαινόμενα κατανομής ενζυμικού αναστολέα έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση ή την αύξηση της επίδρασής του ανάλογα με το εάν έλκεται ή απωθείται από τον φορέα.
- Για αναστολείς μικρού μοριακού βάρους, φαινόμενα διαχύσεως επηρεάζουν την αντίδραση του ακινητοποιημένου βιοκαταλύτη, ενώ αντίθετα οι μεγαλομοριακοί αναστολείς εμφανίζουν περιορισμένη επίδραση επί της αντίδρασης.
- Αν ο βιοκαταλύτης αναστέλλεται από το προϊόν, τότε ο περιορισμός διάχυσης οδηγεί σε συσσώρευση του προϊόντος και επιδείνωση της αναστολής του ακινητοποιημένου ενζύμου.
- Αντίθετα, εάν ο βιοκαταλύτης αναστέλλεται από το υπόστρωμα, η αναστολή γίνεται αντιληπτή σε υψηλότερες συγκεντρώσεις υποστρώματος συγκριτικά με το ελεύθερο ένζυμο.

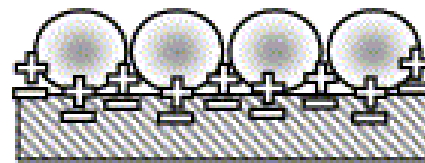
Ακίνητοποίηση κυττάρων

Μέθοδοι ακίνητοποίησης κυττάρων

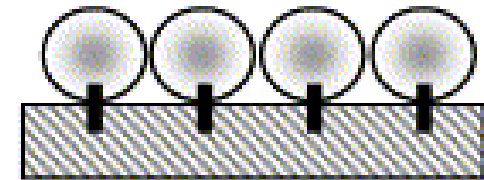
1. Ακίνητοποίηση σε επιφάνεια



Προσρόφηση
σε επιφάνεια

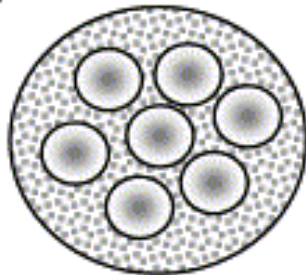


Ακίνητοποίηση σε
επιφάνεια λόγω
ηλεκτροστατικών
δυνάμεων

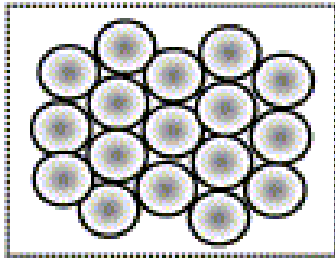


Ακίνητοποίηση σε
επιφάνεια με
ομοιοπολικούς
δεσμούς

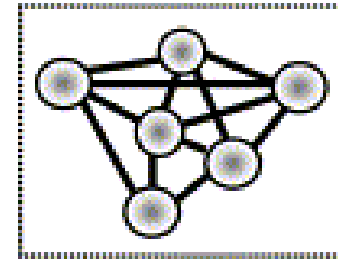
2. Εγκλωβισμός σε πορώδη υλικό



3. Δημιουργία συσσωματωμάτων

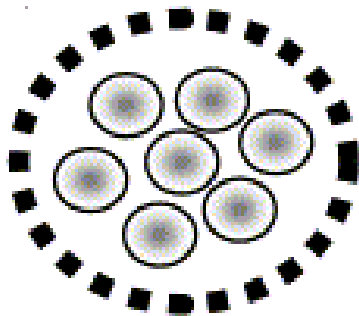


**Δημιουργία φυσικών
συσσωματωμάτων**

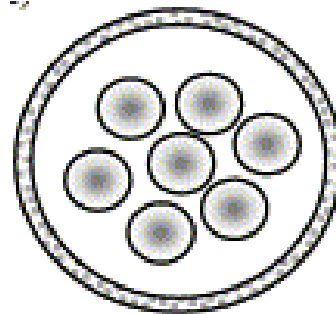


**Διαμοριακή σύνδεση
των κυττάρων**

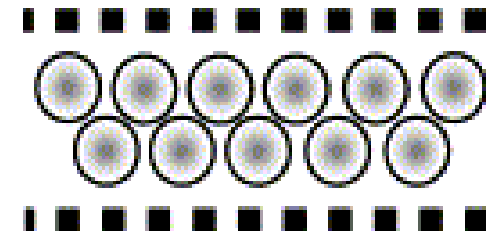
4. Μηχανική συγκράτηση



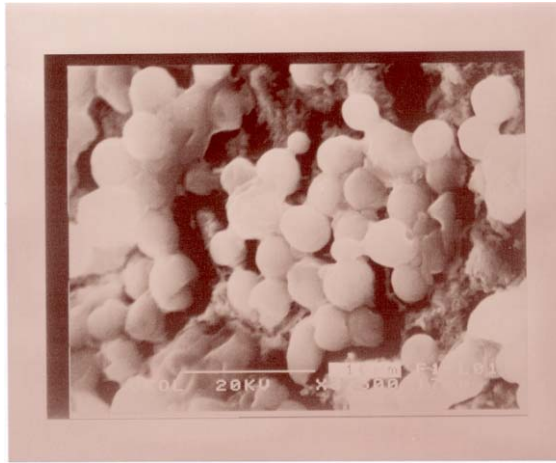
**Εγκλωβισμός
κυττάρων σε
μικροκάψουλα**



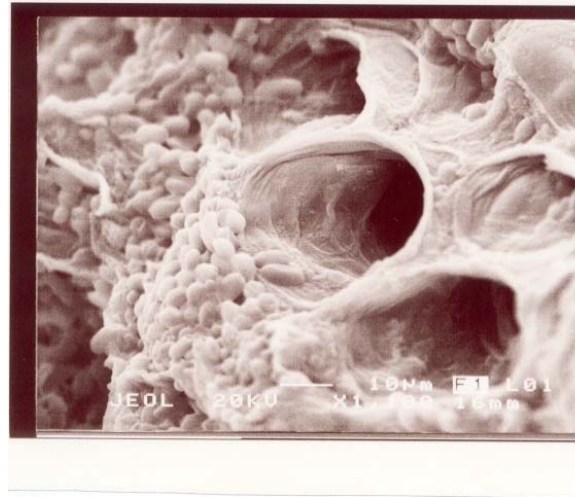
**Εγκλωβισμός κυττάρων σε
επιφάνεια αλληλεπίδρασης
δύο μη αναμίξιμων υγρών**



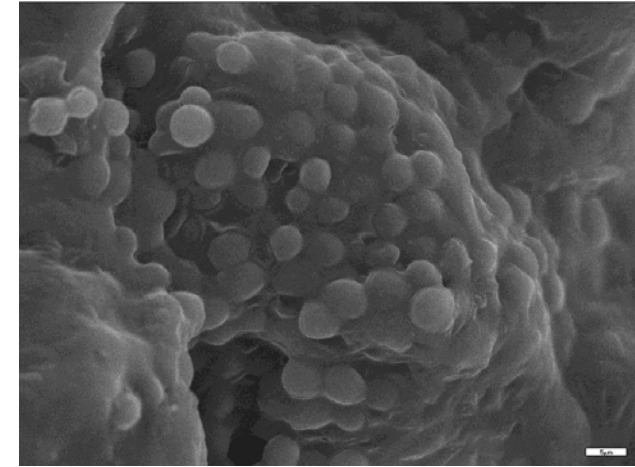
**Συγκράτηση μεταξύ
μικροπορώδων
μεμβρανών**



A

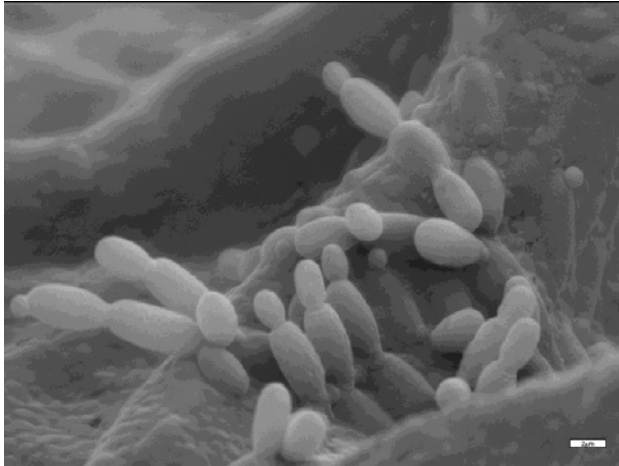


B

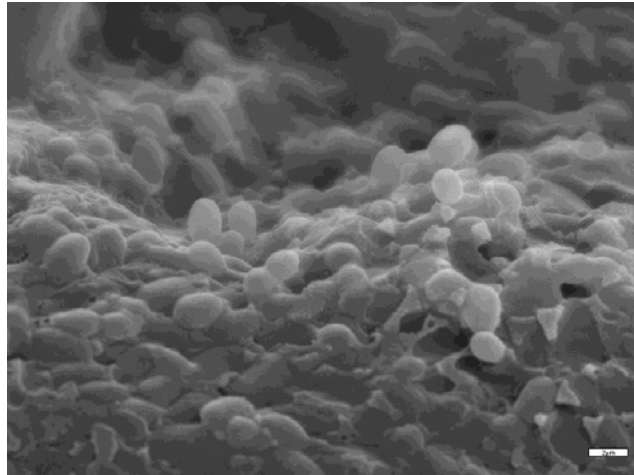


Γ

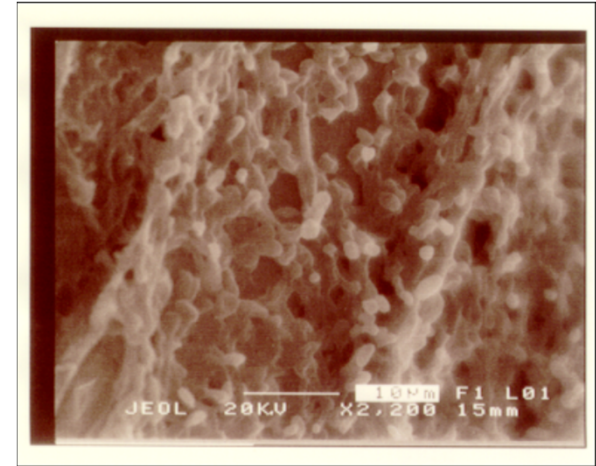
Σχ. 60. Συστήματα ακινητοποιημένων κυττάρων. Ακινητοποιημένα κύτταρα *Saccharomyces cerevisiae* σε Α. Κομμάτια μήλου, Β. Κομμάτια κυδωνιού, Γ. Κομμάτια αχλαδιού.



A



B



Γ

Σχ. 61. Συστήματα ακινητοποιημένων κυττάρων. Ακινητοποιημένα κύτταρα *Lactobacillus casei* σε Α. Κομμάτια μήλου, Β. Κομμάτια κυδωνιού, Γ. Απολιγνηνοποιημένα κυτταρινούχα υλικά.

Επίδραση της ακινητοποίησης στο κύτταρο

- Υπάρχουν αναφορές ότι η ακινητοποίηση αλλάζει τη μορφολογία των κυττάρων, π.χ. έχει αναφερθεί ασυμμετρία στο σχήμα εγκλωβισμένων κυττάρων σε πηκτή αλγινικού ασβεστίου, πιθανόν λόγω περιορισμού του χώρου ανάπτυξης.
- Έχει αναφερθεί, επίσης, σημαντική αύξηση της αντοχής ακινητοποιημένων κυττάρων σε συνθήκες αποθήκευσης.
- Πέρα από τις μορφολογικές διαφορές, τα ακινητοποιημένα κύτταρα παρουσιάζουν διαφορετική φυσιολογία και διαφορετικό ενδοκυτταρικό περιεχόμενο σε συγκεκριμένους μεταβολίτες, π.χ. σε κύτταρα *S. cerevisiae* εγκλωβισμένα σε ζελατίνη έχουν αναφερθεί υψηλότερες περιεκτικότητες δομικών πολυσακχαριτών, DNA και RNA σε σχέση με ελεύθερα κύτταρα.
- Ο ρυθμός ανάπτυξης και πρόσληψης σακχάρων των ακινητοποιημένων κυττάρων είναι μεγαλύτερος των ελεύθερων κυττάρων.

- Παρατηρήθηκε ότι σε εξωκυτταρικό pH 4.5, το ενδοκυτταρικό pH για τα ελεύθερα κύτταρα ήταν 6.94, ενώ για τα ακινητοποιημένα 6.74.
- Η μειωμένη αυτή τιμή του ενδοκυτταρικού pH έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστηριότητας των ενζύμων της γλυκολυτικής οδού.
- Έτσι, η δραστηριότητα της φωσφοφρουκτοκινάσης, της εξοκινάσης, καθώς και της ATPάσης σχεδόν διπλασιάζεται.
- Η διαφορά στο ενδοκυτταρικό pH αποδίδεται σε μεγαλύτερη διαπερατότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης.
- Κατά συνέπεια, καταναλώνονται μεγαλύτερα ποσά ATP για διατήρηση της ισορροπίας του ενδοκυτταρικού pH.
- Επίσης, παρατηρήθηκε ότι, ενώ το βέλτιστο pH για ζύμωση με ελεύθερα κύτταρα *S. cerevisiae* είναι περίπου 4.0, η ζυμωτική ικανότητα των ακινητοποιημένων κυττάρων σε αλγινικά είναι ανεπηρέαστη σε εύρος pH 2.5-6.2.

- Τέλος, η ακινητοποίηση πιθανόν να οδηγήσει σε μη επιθυμητά αποτελέσματα, π.χ. ακινητοποίηση κυττάρων *Bacillus amyloliquefaciens* σε αλγινικό ασβέστιο οδήγησε σε αναστολή παραγωγής του ενζύμου α -αμυλάση για εκτεταμένη χρονική περίοδο.

Πίνακας 4. Διαφορές στον μεταβολισμό ελεύθερων και ακινητοποιημένων κυττάρων.

	Ελεύθερα κύτταρα	Ακινητοποιημένα κύτταρα
Πρόσληψη γλυκόζης* [mmol/(L κυττάρων min)]	21.1	42.7
Παραγωγή αιθανόλης [mmol/(L κυττάρων min)]	37.1	70.0
Παραγωγή γλυκερόλης [mmol/(L κυττάρων min)]	3.5	6.9

* το 1L κυττάρων αντιστοιχεί σε 1.6kg υγρή βιομάζα

Προϋποθέσεις φορέα ακινητοποίησης

- Για να χρησιμοποιηθεί ένας φορέας ως υπόστρωμα ακινητοποίησης, πρέπει να τηρούνται ορισμένες προϋποθέσεις:

1. Διατήρηση της ζωτικότητας των ακινητοποιημένων κυττάρων.

- Η βιολογική δράση των ακινητοποιημένων κυττάρων δεν πρέπει να μεταβάλλεται με την ακινητοποίηση.

2. Ο βιοκαταλύτης πρέπει να διατηρεί ικανοποιητική μηχανική, χημική και βιολογική σταθερότητα.

- Δεν πρέπει να είναι ευαίσθητος στη δράση ενζύμων, διαλυτών, μεταβολών της πίεσης ή δυνάμεων αποκοπής (shear force).

3. Ο βιοκαταλύτης πρέπει να είναι ή να παρασκευάζεται από φθηνά υλικά και να υπόκειται εύκολα σε διαδικασίες κλιμάκωσης βιομηχανικής κλίμακας (scale-up).

4. Το πορώδες του βιοκαταλύτη πρέπει να είναι αμετάβλητο και ελεγχόμενο.
 - Η ελεύθερη μετακίνηση των υποστρωμάτων, προϊόντων, και αερίων είναι βασική για αποδοτική λειτουργία των ακινητοποιημένων κυττάρων.
5. Να υπάρχει η δυνατότητα αποστείρωσης του φορέα πριν την ακινητοποίηση.
6. Να υπάρχει η δυνατότητα αναγέννησης του βιοκαταλύτη.
7. Η μέθοδος ακινητοποίησης να είναι εύκολη και φθηνή.
8. Να υπάρχει η δυνατότητα χρήσης του ακινητοποιημένου βιοκαταλύτη σε διάφορους τύπους βιοαντιδραστήρων.
9. Να είναι χαμηλού κόστους και άφθονος στη φύση (υψηλή διαθεσιμότητα).
10. Υψηλή καθαρότητα όταν προορίζεται για παραγωγή τροφίμων (food-grade purity).